

LEILANE CALINE SILVA

APLICAÇÃO DE ESPECTROMETRIA DE MASSA NO CONTROLE DE QUALIDADE
DE INOCULANTES COMERCIAIS AGRÍCOLAS CONTENDO BACTÉRIAS
PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre em Ciências
(Bioquímica) ao Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências
Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Magalhães Cruz

CURITIBA

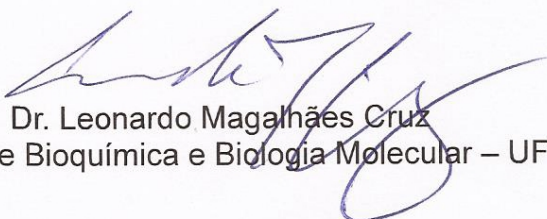
2014

TERMO DE APROVAÇÃO

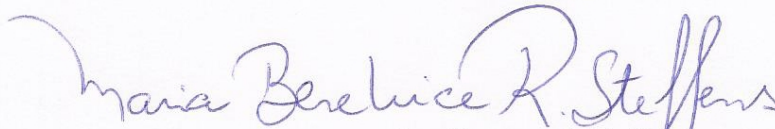
LEILANE CALINE SILVA

APLICAÇÃO DE ESPECTROMETRIA DE MASSA NO CONTROLE DE QUALIDADE DE INOCULANTES COMERCIAIS AGRÍCOLAS CONTENDO BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL

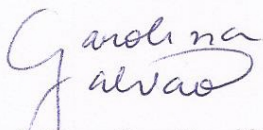
Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências – Bioquímica no Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pela comissão Examinadora formada pelos professores:



Prof. Dr. Leonardo Magalhães Cruz
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Prof. Dra. Maria Berenice Reynaud Steffens
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Prof. Dra. Carolina Weigert Galvão
Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética – UEPG

Curitiba, 28 de fevereiro de 2014.

Dedico esta dissertação à minha família, meu pai Luiz, minha mãe Osmária, meus irmãos Luciano, Lucas e Letícia, e minha avó Wilma.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Leonardo Magalhães Cruz, pela orientação, ensinamentos e dedicação a este projeto, sempre acessível a ajudar e tirar dúvidas;

À minha família: meu pai, minha mãe, meus irmãos e minha avó por incentivarem meus estudos e por todos os ensinamentos, por incentivarem minha carreira acadêmica, acreditarem no meu sucesso e por toda ajuda dada quando foi preciso;

Aos meus amigos: Paulo, Mariana, Gabriela, Elisana e Eliane, que encontrei na faculdade e são verdadeiramente para o resto da vida, nem tenho palavras para descrever o que eles representam para mim; ao Nicholas, que sempre escutou pacientemente meus desabafos pela internet e me aconselhou sempre que possível; à Angelica, amiga irmã, que deixei de visitar muitas vezes por causa de prazos mas mesmo assim não me abandonou; à Ana Carla, amiga da livraria que virou amiga para a vida toda e sei que posso contar sempre;

Aos meus amigos que conheci durante o Mestrado: Melina e Andressa, minhas parceiras e confidentes, desde o início juntas e iremos até o fim; Danilo, que a 5 anos atrás foi meu professor e hoje é uma dos meus melhores amigos, dividindo as contas e me ajudando a enxergar e tomar sempre as melhores decisões; Caroline, inicialmente por ajudar no trabalho e que se tornou uma grande parceira também;

Aos amigos do laboratório 271-272: Rafaela, Rocío e Vanessa, por estarem todos os dias junto comigo no laboratório rindo e/ou chorando, e em especial a Maria Isabel pela enorme paciência e pela experiência passada; Thiago, Heloísa, Edileusa, Marcelo e Luíza pelos momentos de descontração, conversas e risadas;

Aos amigos da turma de Mestrado 2012-2014, em especial o Alex (o meu Maninho);

Aos técnicos de laboratório do Núcleo de Fixação Biológica de Nitrogênio: Alex, Valter de Baura e Dona Roseli Prado, por todo o auxílio prestado e sugestões, sem eles este projeto não seria realizado com êxito;

Às empresas que forneceram gentilmente amostras dos seus produtos de inoculantes para as análises deste trabalho;

Aos demais professores do Núcleo de Fixação Biológica de Nitrogênio, pelas opiniões pertinentes e pelos conhecimentos à disposição de todos;

À Sra. Irene, secretária da Pós-Graduação, que sempre bem humorada me ajudou desde a primeira vez que entrei pela sua porta;

Ao Prof. Adriano Viana, por apresentar a Bioquímica na minha vida e ministrar a disciplina brilhantemente na UEPG;

À Prof. Dra. Carolina Weigert Galvão, por me aceitar em seu laboratório como iniciação científica e me apresentar à Bioquímica da UFPR, por me orientar no TCC, e hoje estar disponível para ser minha banca de defesa do Mestrado;

À Prof. Dra. Maria Berenice Reynaud Steffens, pela disponibilidade de estar na minha banca de defesa do Mestrado;

Ao Prof. Dr. Marcelo Müller, pela avaliação do projeto e sugestões que fizeram diferença;

Ao Prof. Dr. Marcos Pileggi, por mostrar o quão grande é a ciência e o quão grande é nossa ignorância sobre as coisas que achamos que sabemos e que ainda temos que descobrir;

Aos órgãos de fomento, em especial à CAPES, por fornecer a bolsa de estudos, sem ela eu não teria vindo à Curitiba e feito o Mestrado;

À Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica pela oportunidade de cursar o Mestrado;

E a todos que me ajudaram e me deram força de alguma maneira.

“O sucesso é ir de fracasso em fracasso sem perder o entusiasmo.”

Winston Churchill.

RESUMO

As rizobactérias promotoras do crescimento vegetal (PGPR) são bactérias do solo benéficas para o crescimento de plantas e para a agricultura pois podem influenciar positivamente no rendimento da safra. Bactérias do gênero *Azospirillum* são consideradas PGPR e vem sendo estudadas na aplicação em culturas de gramíneas. Inoculantes com estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *Azospirillum brasilense* já são comercializados para culturas de milho e trigo, além de inoculantes contendo outras espécies de bactérias para culturas como a soja, cana-de-açúcar, feijão, entre outras. Por se tratar de um produto com material biológico, é preciso de um método de controle de qualidade eficiente na identificação de bactérias. A espectrometria de massa MALDI-TOF é um método eficiente, rápido e barato utilizado na identificação de microrganismos. Muitos estudos comprovam a identificação de bactérias de interesse clínico, contudo há um aumento em estudos de interesse ambiental, agrícola e controle de qualidade, por exemplo. Tendo em vista o potencial dos inoculantes contendo bactérias promotoras do crescimento vegetal, do grande uso destes produtos pelos agricultores e o potencial do MALDI-TOF, o objetivo principal deste trabalho foi aplicar a técnica de MALDI-TOF MS na identificação de estirpes de bactérias para o controle de qualidade de inoculantes comerciais usados em culturas agrícolas. Como resultados, foram obtidos espectros de massa de MALDI-TOF de estirpes referência FP2, Sp245, Ab-V5, Ab-V6, Ab-V7 de *Azospirillum brasilense*, DSM 1691 de *Azospirillum lipoferum* e BL21 de *Escherichia coli* como picos representativos para comparações com os picos dos isolados de inoculantes. Foi possível a separação de espécie e de estirpes de *Azospirillum* através da análise desses picos. Sete inoculantes de *Azospirillum* foram analisados seguindo o protocolo de controle de qualidade recomendado pela RELARE, não havendo sido constatado contaminação. Entretanto, um único inoculante atingiu o número de células viáveis por mL recomendado e indicado no rótulo do produto. Colônias de cada meio e de cada diluição foram submetidos à análise em MALDI-TOF MS e cada inoculante obteve picos representativos que foram comparados aos picos das estirpes referências. Um dos inoculantes foi misturado a cultura da bactéria *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 marcada, na proporção de 1:1 (simulando uma contaminação), e os resultados mostraram que foi possível identificar a bactéria “contaminante” e diferenciá-la das estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *A. brasilense*, contidas no inoculante, por comparação de espectros de massa. Plantas de milho foram inoculadas com *A. brasilense* Ab-V5 e inoculante comercial contendo esta mesma estirpe. As bactérias foram re-isoladas das raízes e a identidade da estirpe referência foi confirmada por amplificação por PCR de fragmento estirpe-específico. Entretanto, não houve confirmação dos isolados a partir das raízes de plantas inoculadas com inoculante comercial.

Palavras-chave: MALDI-TOF MS, inoculante, *Azospirillum brasilense*, controle de qualidade.

ABSTRACT

Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) are beneficial microorganisms for growth plants and agriculture because they can positively affect the crop field. Bacteria from genus *Azospirillum* are considered PGPR and they have been studied on application in grass crops. Inoculants with strains Ab-V5 and Ab-V6 of *Azospirillum brasilense* are already marketed for corn and wheat, as well as inoculants containing other species of bacteria for crops as soybean, sugar cane, bean and other. Because it is a product with biological material, it's necessary an efficient method of quality control in the identification of bacteria. Mass spectrometry MALDI-TOF is an efficient, fast and cheap method in the identification of microorganisms. Many studies show the use of the technique of clinic interest, however there is an increase of ambiental, agricultural and quality control studies, for example. In view of the potencial of the inoculants containing PGPR, the great use of these products for farmers and the potencial of MALDI-TOF MS, our objective was apply the technique of identification of microorganisms by MALDI-TOF for quality control of commercial inoculants used in crop yields. As results, it was obtained mass spectra MALDI-TOF of reference-strains of FP2, Sp245, Ab-V5, Ab-V6, Ab-V7 of *Azospirillum brasilense*, DSM 1691 of *Azospirillum lipoferum* and BL21 of *Escherichia coli* as representative peaks for comparison with peaks from isolates of inoculants. It was possible to separate specie from specie and strain from strain of *Azospirillum* by analysis of those peaks. Seven inoculants of *Azospirillum* were analysed following quality control protocol recommended by RELARE, they have not presented contamination, just one inoculant reached the number of viable cells per mL that was indicated on the product label. Colonies of each medium and each dilution were submitted to MALDI-TOF analysis and each inoculant obtained representative peaks that were compared to the reference strains peaks. An inoculant was mixed with a labeled *Herbaspirillum seropedicae* SmR1, on 1:1 proportion (simulating contamination) and results have shown that was possible to identify "contaminant" bacterium and to differentiate from strains Ab-V5 and Ab-V6 for spectra comparison. It was inoculated in corn root *A. brasilense* Ab-V5 and commercial inoculant with same strain. Bacteria were re-isolated from root and the identification of reference-strain was confirmed by fragment specific-strain amplification. However it there wasn't success of identification at re-isolated bacteria from root inoculated with commercial inoculant.

Keywords: MALDI-TOF MS, inoculant, *Azospirillum brasilense*, quality control.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. ESQUEMA REPRESENTATIVO DA RIZOSFERA.....	16
Figura 2. MECANISMOS DE AÇÃO DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL POR RIZOBACTÉRIAS.....	17
Figura 3. RAÍZES DE SOJA.....	26
Figura 4. COMPARAÇÃO ENTRE VENDAS DE INOCULANTES* E ÁREA DE SOJA PLANTADA**	26
Figura 5. RAÍZES DE MILHO.....	28
Figura 6. ESQUEMA TÉCNICO DO FUNCIONAMENTO DE MALDI-TOF MS.....	30
Figura 7. DENDROGRAMA BASEADO EM ESPECTROS GERADOS EM MALDI-TOF MS DE CÉLULAS INTEIRAS POR ESPÉCIES DE <i>Azospirillum</i> E ESTIRPES REFERÊNCIA.....	32
Figura 8. ESPECTROS DE MASSA EXEMPLIFICANDO OS PICOS ANALISADOS. FP2 - <i>A. brasilense</i> FP2, DSM 1691 – <i>A. lipoferum</i> DSM 1691, BL21 – <i>E. coli</i> BL21.	46
Figura 9. DENDROGRAMA DE ESTIRPES-REFERÊNCIA A PARTIR DE ESPECTROS DE MASSA.....	47
Figura 10. ESPECTROS DE MASSA ANALISADOS ESTIRPES DE <i>Azospirillum brasilense</i> FP2 E Sp245.....	48
Figura 11. ESPECTROS DE MASSA ANALISADOS DE <i>Azospirillum brasilense</i> FP2 E Ab-V5.....	49
Figura 12. ESPECTROS DE MASSA ANALISADOS DE <i>Azospirillum brasilense</i> Sp245 E Ab-V7.....	50
Figura 13. ESPECTROS DE MASSA ANALISADOS DE <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5, Ab-V6 E Ab-V7.....	51
Figura 14. MÉDIA GERAL DE UFC/mL POR MEIOS DE CULTURA SEMI-SELETIVOS DE TRÊS DILUIÇÕES.....	53
Figura 15. MÉDIA DE UFC/mL ADQUIRIDA ATRAVÉS DA CONTAGEM EM PLACAS DE CRESCIMENTO NOS MEIOS NA, BDA, DYGS E NFb 3x EM DILUIÇÃO 10 ⁻⁵ ...	53
Figura 16. MÉDIA DE UFC/mL ADQUIRIDA ATRAVÉS DA CONTAGEM EM PLACAS DE CRESCIMENTO NOS MEIOS NA, BDA, DYGS E NFb 3x EM DILUIÇÃO 10 ⁻⁶ ...	54

Figura 17. MÉDIA DE UFC/mL ADQUIRIDA ATRAVÉS DA CONTAGEM EM PLACAS DE CRESCIMENTO NOS MEIOS NA, BDA, DYGS e NFb 3x EM DILUIÇÃO 10^{-7} ...	54
Figura 18. MÉDIA DE CRESCIMENTO DE UFC EM MEIOS SEMI-SELETIVOS COM CONTAMINAÇÃO ARTIFICIAL DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> RAM4.....	56
Figura 19. CONTAGEM DE UFC/mL DE COLÔNIAS DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> RAM4.....	57
Figura 20. COLÔNIAS DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> RAM4 SOB FLUORESCÊNCIA DE LUZ UV A 270 nm.....	57
Figura 21. ESPECTROS REPRESENTATIVOS DE INOCULANTES CONTRA ESPECTROS DE REFERÊNCIA.....	62
Figura 22. ESPECTROS REPRESENTATIVOS DE INOCULANTES CONTRA ESPECTROS DE REFERÊNCIA.....	63
Figura 23. AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTO DE 90 PB ESTIRPE-ESPECÍFICO PARA <i>A. brasilense</i> FP2/Ab-V5 A PARTIR DE COLÔNIAS ISOLADAS DE RAIZ DE MILHO DA 1ª COLETA.....	65
Figura 24. AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTO DE 90 PB ESTIRPE-ESPECÍFICO PARA <i>A. brasilense</i> FP2/Ab-V5 A PARTIR DE COLÔNIAS ISOLADAS DE RAIZ DE MILHO INOCULADO COM Ab-V5.....	65
Figura 25. AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTO DE 90 PB ESTIRPE-ESPECÍFICO PARA <i>A. brasilense</i> FP2/Ab-V5 A PARTIR DE COLÔNIAS ISOLADAS DE RAIZ DE MILHO INOCULADO COM Ab-V5 DA 2ª COLETA.....	66
Figura 26. ESPECTROS DE MASSA DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE RAIZ DE MILHO INOCULADAS COM <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5.....	68
Figura 27. ESPECTROS DE MASSA DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE RAIZ DE MILHO INOCULADAS COM INOCULANTE COMERCIAL.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. EXEMPLOS DE INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL EM CULTURAS.....	19
Tabela 2. COMPARAÇÃO ENTRE RIZÓBIOS E BACTÉRIAS DE VIDA LIVRE NA FUNÇÃO DE FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO.....	24
Tabela 3. ESPÉCIES E ESTIRPES DE BACTÉRIAS UTILIZADAS COMO REFERÊNCIA.....	37
Tabela 4. INOCULANTES COMERCIAIS CONTENDO <i>Azospirillum brasilense</i>	38
Tabela 5. PICOS MAIS FREQUÊNTES OBSERVADOS EM ESPECTROS DE <i>Escherichia coli</i> BL21, <i>Azospirillum brasilense</i> FP2 E <i>Azospirillum lipoferum</i> DSM 1691.....	48
Tabela 6. PICOS EXTRAÍDOS DE ESPECTROS DE <i>A. brasilense</i> FP2 E <i>A. brasilense</i> Sp245.....	50
Tabela 7. PICOS OBTIDOS EM ESPECTROS DE <i>A. brasilense</i> FP2 E DE SUA ESTIRPE DERIVADA <i>A. brasilense</i> Ab-V5.....	51
Tabela 8. PICOS OBTIDOS EM ESPECTROS DE <i>A. brasilense</i> Sp245 E DE SUA ESTIRPE DERIVADA <i>A. brasilense</i> Ab-V7.....	52
Tabela 9. COMPARAÇÃO DE PICOS OBTIDOS DE ESPECTROS DE ESTIRPES COMERCIALIZADAS COMO INOCULANTE.....	53
Tabela 10. LISTA DE PICOS DOS INOCULANTES 1 A 7 ANALISADOS POR MALDI-TOF MS.....	60
Tabela 11. COMPOSIÇÃO DO BANCO DE DADOS DE ESPECTROS DE MASSA GERADO.....	63
Tabela 12. LISTA DE PICOS DE COLÔNIAS RE-ISOLADAS DE RAIZ DE MILHO INOCULADA COM <i>A. brasilense</i> AB-V5 E INOCULANTE COMERCIAL.....	69
Tabela 13. CONTAGEM DE UFC/mL DO INOCULANTE 1.....	82
Tabela 14. CONTAGEM DE UFC/mL DO INOCULANTE 2.....	82
Tabela 15. CONTAGEM DE UFC/mL DO INOCULANTE 3.....	83
Tabela 16. CONTAGEM DE UFC/mL DO INOCULANTE 4.....	83
Tabela 17. CONTAGEM DE UFC/mL DO INOCULANTE 5.....	83
Tabela 18. CONTAGEM DE UFC/mL DO INOCULANTE 6.....	84
Tabela 19. CONTAGEM DE UFC/mL DO INOCULANTE 7.....	84

LISTA DE SIGLAS

ACC	–	Enzima ácido 1-carboxílico-1-amino ciclopropano
ANPII	–	Associação Nacional dos Produtores e Importadores de Inoculantes
BDA	–	Ágar batata-dextrose
BLAST	–	Basic Local Alignment Search Tool
BS	–	Tampão borato de sódio
CONAB	–	Companhia Nacional De Abastecimento
EDTA	–	Ácido etilenodiamino-tetra ético
EMBRAPA	–	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ESI MS	–	Eletrospray Ionization Mass Spectrometry
FAPANPII	–	Fundo de Apoio à Pesquisa pela Associação Nacional dos Produtores e Importadores de Inoculantes
FBN	–	Fixação Biológica de Nitrogênio
HCCA	–	α -ciano-4-ácido hidroxicinâmico
IBGE	–	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IJSEM	–	International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology
ITS	–	Amplificação de fragmentos intergênicos 16S-23S
m/v	–	massa/volume
MALDI-TOF	–	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight
MAPA	–	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MS	–	Espectrometria de Massa
NA	–	Ágar-nutriente
PGPR	–	Rizobactérias promotoras do crescimento vegetal
RELARE	–	Rede de Laboratórios para a Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola
TFA	–	Ácido trifluoracético
U	–	Unidade enzimática
UFC	–	Unidades formadoras de colônias
UV	–	Ultravioleta

LISTA DE ABREVIATURAS

®	–	Marca registrada
Ab-V5	–	<i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5
Ab-V6	–	<i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V6
Ab-V7	–	<i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V7
BL21	–	<i>Escherichia coli</i> BL21
DSM 1691	–	<i>Azospirillum lipoferum</i> DSM 1691
FP2	–	<i>Azospirillum brasilense</i> FP2
ha	–	hectare
Km	–	antibiótico Canamicina
<i>m/z</i>	–	razão massa/carga
N	–	Nitrogênio
Nal	–	antibiótico Ácido Nalidíxico
NH ₄ ⁺	–	amônio
RAM4	–	<i>Herbaspirillum seropedicae</i> RAM4
Sm	–	antibiótico Estreptomicina
Sp245	–	<i>Azospirillum brasilense</i> Sp245
t	–	tonelada

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL	16
1.2 O GÊNERO <i>AZOSPIRILLUM</i>	20
1.3 TECNOLOGIA DE INOCULANTES	22
1.4 MALDI-TOF MS	28
2. JUSTIFICATIVA	33
3. OBJETIVOS	34
3.1 OBJETIVO GERAL	34
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
4. MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 BACTÉRIAS E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO	35
4.2 CONTROLE DE QUALIDADE DE INOCULANTES COMERCIAIS	37
4.2.1.1 ISOLAMENTO E CONTAGEM DE <i>Azospirillum brasilense</i>	37
4.2.1.2 CULTIVO DE ESTIRPES USADAS COMO REFERÊNCIA	37
4.2.1.3 CONTAMINAÇÃO ARTIFICIAL DE INOCULANTE	38
4.3 TÉCNICA DE ESPECTROMETRIA DE MASSA	38
4.3.1 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE NO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS MALDI-TOF	38
4.3.2 ANÁLISE DAS AMOSTRAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA	39
4.4 TÉCNICAS DE MANIPULAÇÃO DO DNA	40
4.4.1 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA REAÇÃO DA PCR A PARTIR DE CULTURAS	40
4.4.2 AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTO ESTIRPE-ESPECÍFICO	41
4.4.3 AMPLIFICAÇÃO DO GENE 16S rRNA POR PCR	41
4.4.4 PURIFICAÇÃO DO PRODUTO AMPLIFICADO	42
4.4.5 SEQUENCIAMENTO DO GENE 16S rRNA DOS ISOLADOS	42
4.4.6 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS	43
4.5 ENSAIO <i>in planta</i> COM MILHO	43
4.5.1 DESINFESTAÇÃO DA SUPERFÍCIE DAS SEMENTES DE MILHO	43
4.5.2 CULTIVO DE PLANTAS EM SISTEMA HIDROPÔNICO INOCULADOS COM	

<i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5 E INOCULANTE COMERCIAL.....	43
4.5.3 REISOLAMENTO DAS ESTIRPES DE <i>Azospirillum brasilense</i> DE RAÍZES DE MILHO INOCULADAS.....	44
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
5.1 OBTENÇÃO DOS ESPECTROS DE ESTIRPES REFERÊNCIA.....	45
5.2 ANÁLISE DE INOCULANTES COMERCIAIS CONTENDO ESTIRPES DE <i>Azospirillum brasilense</i>	52
5.2.1 CONTROLE DE QUALIDADE USANDO O MÉTODO PADRONIZADO DA RELARE.....	52
5.2.2 CONTAMINAÇÃO ARTIFICIAL DE INOCULANTE.....	55
5.2.3 ESPECTROMETRIA DE MASSA NA IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS DE INOCULANTES COMERCIAIS.....	58
5.3.1 REISOLAMENTO DE <i>A. brasilense</i> Ab-V5.....	64
5.3.2 REISOLAMENTO DE <i>A. brasilense</i> Ab-V5 E Ab-V6 PRESENTES EM INOCULANTE COMERCIAL.....	66
5.3.3 ANÁLISE DE ESPECTROMETRIA DE MASSA DE ISOLADOS DE RAIZ DE MILHO.....	67
6. CONCLUSÕES.....	69
REFERÊNCIAS.....	70
APÊNDICES.....	80
ANEXOS.....	83

1. INTRODUÇÃO

1.1 RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL

As rizobactérias promotoras do crescimento vegetal, ou PGPR (do inglês “*plant growth promoting rhizobacteria*”) são bactérias do solo benéficas para o crescimento de plantas (GHOLAMI *et al.*, 2009). Muitos destes microrganismos dependem dos exsudatos de raízes para sobreviver, por isso são normalmente encontrados na rizosfera de plantas (Figura 1), um lugar ideal para a sua proliferação devido aos processos físicos, químicos e biológicos da raiz. Contudo, são encontradas também em rizoplanos e em tecidos da raiz e/ou estruturas especializadas nas raízes – os nódulos. Além das bactérias, também são considerados promotores do crescimento vegetal os actinomicetos e micorrizas (NADEEM *et al.*, 2013).

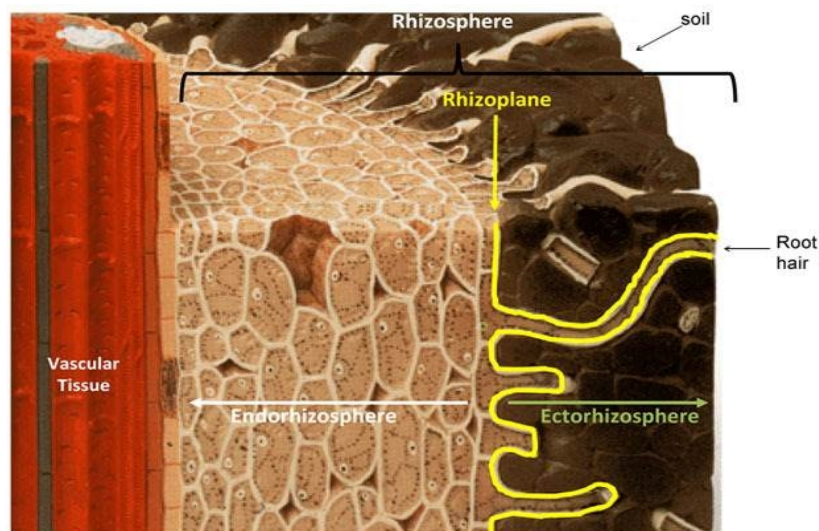


Figura 1. ESQUEMA REPRESENTATIVO DA RIZOSFERA.

A rizosfera é constituída por três camadas: endorizosfera – representada pelas células do córtex radicular e espaços intercelulares do córtex; rizoplane – superfície da raiz em contato com o solo, composta das células epiteliais radiculares e mucilagem; ectorizosfera – partículas do solo mais próximas da raiz que não estão em contato com o epitélio da raiz.

A promoção do crescimento vegetal acontece por ações diversas, tais como: produção de fitormônios (auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico e etileno); fixação de nitrogênio; solubilização de fosfato; e produção de substâncias reguladoras ou sideróforos (TIEN *et al.*, 1979; SAXENA; MODI e MODI 1986;

SESHADRI *et al.*, 2000; STEENHOUDT; VANDERLEYDEN 2000; HARTMANN; BALDANI 2003; THULER *et al.*, 2003; BASHAN; HOLGUIN e DE BASHAN, 2004; CREUS *et al.*, 2005).

As PGPR são encontradas associadas a culturas vegetais de grande importância agrícola e são capazes de promover o desenvolvimento do sistema radicular e aéreo, aumentar a produtividade de matéria seca e de grãos, aumentar a resistência à seca e a absorção de nutrientes.

De acordo com Nadeem *et al.* (2013) e Ahemad e Kibret (2014), a promoção do crescimento vegetal divide-se em mecanismo direto e mecanismo indireto. A promoção de crescimento direta ocorre quando compostos benéficos são fornecidos por uma bactéria à planta hospedeira ou facilitam a absorção de nutrientes do solo, as quais produzem fitormônios, fixam nitrogênio, solubilizam fósforo, produzem a enzima ácido 1-carboxílico-1-amino ciclopropano (ACC) e produzem alguns sideróforos secretados que ajudam na solubilização e absorção de ferro. A promoção de crescimento indireta ocorre quando a rizobactéria previne ou reduz alguns efeitos dos patógenos da planta, que podem incluir a inibição de patógenos pela produção de substâncias reguladoras ou pelo aumento da resistência da planta hospedeira contra o organismo patogênico através da produção de sideróforos. A Figura 2 mostra de forma simplificada as formas de ação das rizobactérias para a promoção do crescimento vegetal.

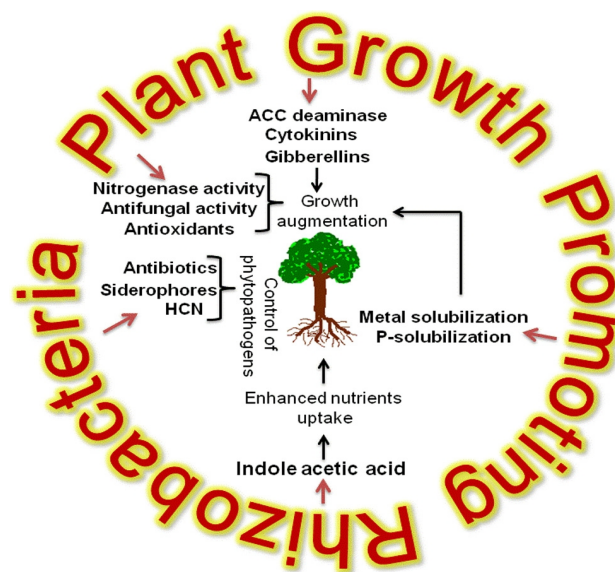


Figura 2. MECANISMOS DE AÇÃO DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL POR RIZOBACTÉRIAS.

FONTE: AHMAD; KIBRET, 2014.

Apesar da eficiência das bactérias promotoras do crescimento vegetal, estas

podem agir também como bactérias inibidoras do crescimento, dependendo de suas características, forma de ação e das condições específicas da associação. Nadeem *et al.* (2013) relatam que a produção de cianeto por espécies de *Pseudomonas* pode ser considerada promoção bem como inibição de crescimento, pois o cianeto pode ser um agente de controle biológico para certos patógenos e causar efeitos adversos no crescimento da planta. Outro exemplo é a auxina, que em baixas concentrações melhora o crescimento da planta e em altas concentrações inibe o crescimento da raiz.

Há um interesse de aplicação na agricultura destes microrganismos como biofertilizantes e biopesticidas, bem como aplicações de fitorremediação e rizorremediação (NADEEM *et al.*, 2013; COMPANT; CLÉMENT e SESSITSCH, 2010). Segundo Steenhoudt e Vanderleyden (2000) *Azospirillum* é o gênero melhor caracterizado de rizobactérias promotoras do crescimento de plantas, além de outras PGPR diazotrofos endofíticos associados com plantas como *Gluconacetobacter diazotrophicus* (JAMES *et al.*, 1994), *Herbaspirillum seropedicae* (RONCATO-MACCARI *et al.*, 2003), *Azoarcus* sp. (ENGELHARD *et al.*, 2000) e *Azotobacter* sp. (MARTINEZ-TOLEDO; GONZALEZ-LOPEZ, 1989). A pesquisa envolvendo a produção de culturas inoculadas com estes organismos tem mostrado um aumento significativo na produção, da ordem de 30% em culturas de trigo, milho, sorgo e arroz e podendo chegar a 60% na cultura de cana-de-açúcar (STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000).

A diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas varia nos estágios de desenvolvimento e nas diferentes partes da planta. Barraquio e colaboradores (1997) verificaram que o número de diazotrofos endofíticos em raízes e colmos de variedades de arroz irrigado variou nos diferentes estágios de desenvolvimento, atingindo número máximo no florescimento. Rodrigues *et al.* (2006) estudando a diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* na cultura do arroz inundado concluíram que as populações de bactérias diazotróficas oscilam durante o desenvolvimento das variedades de arroz e o número de bactérias diazotróficas endofíticas do gênero *Burkholderia* é maior do que do gênero *Herbaspirillum* nas duas variedades utilizadas. Esses resultados sugerem que a diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas parece estar condicionada à espécie vegetal. A Tabela 1 exemplifica outras culturas com suas

respectivas bactérias relatadas na literatura, mostrando a grande diversidade de bactérias e plantas hospedeiras formando associações com potencial para uso biotecnológico.

Tabela 1. EXEMPLOS DE INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL EM CULTURAS.

CULTURA	BACTÉRIA
Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	<i>Pseudomonas</i> spp.
	<i>Pseudomonas putida</i>
	<i>Azospirillum lipoferum</i>
	<i>Azotobacter chroococcum</i>
	<i>Achromobacter piechaudii</i> ARV8
	<i>Bacillus</i> spp.
Alfalfa (<i>Medicago sativa</i>)	<i>Bacillus pumillus</i>
	<i>Bacillus licheniformis</i>
Trevo subterrâneo (<i>Trifolium subterraneum</i> L.)	<i>Pseudomonas putida</i>
Ervilha pintinho (<i>Cicer arietinum</i>)	<i>Mesorhizobium</i> spp.
Maçã (<i>Malus domestica</i>)	<i>Bacillus</i> sp.
	<i>Pseudomonas</i> spp.
	<i>Glomus</i> spp.
Retama (<i>Retama sphaerocarpa</i>)	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<i>Medicago</i> spp. (<i>M. nolana</i> , <i>M. rigidula</i> , <i>M. rotata</i>)	<i>Sinorhizobium meliloti</i> (tipo selvagem e derivado geneticamente modificado)
Trigo (<i>Triticum aestivum</i>)	<i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5 e Ab-V6
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> SBW25
	<i>Paenibacillus brasiliensis</i> PB177
	<i>Enterobacter</i> spp
	<i>Pseudomonas putida</i>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	<i>Serratia proteamaculans</i>
	<i>Pseudomonas</i> spp.
	<i>Enterobacter cloacae</i>
	<i>Serratia ficaria</i>
	<i>Bacillus</i> spp.
Trevo vermelho (<i>Trifolium pratense</i> L.)	<i>Brevibacillus</i> spp.
Alface (<i>Lactuca sativa</i>)	<i>Glomus mosseae</i>
Canola (<i>Brassica napus</i> L.)	<i>Pseudomonas</i> spp.
Mostarda indiana (<i>Brassica juncea</i>)	<i>Rhodococcus</i> spp.
	<i>Variovorax paradoxus</i> spp.
Ervilha (<i>Pisum sativum</i>)	<i>Pseudomonas brassicacearum</i> AM3

	<i>Pseudomonas marginalis</i> Dp1
Milho (<i>Zea mays</i>)	<i>Pseudomonas</i> spp.
	<i>Enterobacter aerogenes</i>
	<i>Flavobacterium ferrugineum</i>

FONTE: Adaptado de NADEEM *et al.*, 2013.

O efeito “promoção de crescimento vegetal” não é isolado de cada mecanismo, mas sim a soma de muitos mecanismos que por consequência ajudam no desenvolvimento da planta e aumentam o rendimento da plantação. Devido à demanda mundial de produção de comida por plantas geneticamente modificadas ou pela utilização de agrotóxicos, as rizobactérias promotoras do crescimento vegetal podem ser vantajosas no que diz respeito à diminuição do uso desses produtos químicos e por já estar disponível aos produtores de países desenvolvidos e países em desenvolvimento (AHEMAD; KIBRET, 2014).

1.2 O GÊNERO AZOSPIRILLUM

As bactérias do gênero *Azospirillum* são microrganismos diazotróficos (capazes de fixar nitrogênio atmosférico), aeróbios, de vida livre, sendo encontrados no solo e associados com raízes de plantas como o milho, trigo, sorgo, arroz, banana e abacaxi. Possuem ampla distribuição geográfica, sendo encontradas em regiões temperadas, subtropicais e tropicais. São eficientes na fixação de nitrogênio *in vitro*, tendo um grande potencial de uso como biofertilizante, já foi isolado de raízes de mais de 100 espécies de plantas e também podem ser aplicadas com sucesso em raízes de plantas que não apresentam histórico de colonização com esta bactéria (DÖBEREINER; DAY, 1976; PEDROSA, 1987; DÖBEREINER, 1991; GUNARTO *et al.*, 1999; CRUZ *et al.*, 2001; BASHAN; HOLGUIN e DE BASHAN, 2004).

Azospirillum spp. são Gram negativas, curvas e móveis, pertencentes a classe das Alfa-Proteobactérias (YOUNG, 1992) e atualmente são descritas dezessete espécies: *A. brasilense*, *A. lipoferum* (TARRAND *et al.*, 1978), *A. halopraeferens* (REINHOLD *et al.*, 1987), *A. amazonense* (MAGALHÃES *et al.*,

1983), *A. irakense* (KHAMAS *et al.*, 1989), *A. largimobile* (SLY; STACKEBRANDT, 1999; BEN DEKHIL *et al.*, 1997; Validation List No. 62 – IJSEM, 1997), *A. doebereineriae* (ECKERT *et al.*, 2001), *A. oryzae* (XIE; YOKOTA, 2005), *A. melinis* (PENG *et al.*, 2006), *A. canadense* (MEHNAZ *et al.*, 2007a), *A. zeae* (MEHNAZ *et al.*, 2007b), *A. rugosum* (YOUNG *et al.*, 2008), *A. fermentarium* (LIN *et al.*, 2013), *A. formosense* (LIN *et al.*, 2012), *A. humicireducens* (ZHOU *et al.*, 2013) *A. picis* (LIN *et al.*, 2009) e *A. thiophilum* (LAVRINENKO *et al.*, 2010). Entre elas, *A. brasilense* e *A. lipoferum* são as melhores caracterizadas (BALDANI; BALDANI, 2005). Estas duas espécies tiveram seus genomas recentemente sequenciados (WISNIEWSKI-DYE *et al.*, 2011).

Estas bactérias são potencialmente benéficas para a agricultura pois são conhecidas como promotoras de crescimento vegetal, podendo influenciar positivamente no crescimento da planta, no rendimento da safra e no conteúdo de nitrogênio da planta. Em certas condições de ambiente e solo, podem produzir substâncias promotoras do crescimento vegetal, como alguns fitormônios (OKON; ITZIGSOHN, 1995; STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000; HUNGRIA *et al.*, 2010; HUNGRIA, 2011; PICCININ *et al.*, 2013). Aumentos significativos no rendimento da produção de grãos são observados com a inoculação de *Azospirillum* spp., juntamente com um aumento no conteúdo de fósforo, potássio e de nitrogênio total das plantas (BASHAN; HOLGUIN e DE BASHAN, 2004). O aumento na produção e o crescimento após a inoculação com estirpes de *Azospirillum* spp. tem sido atribuído principalmente a um efeito geral no crescimento das raízes e uma consequente melhora na capacidade de assimilação de nutrientes e resistência a seca pela planta.

Em experimentos de inoculação em campo, organismos deste gênero mostraram ter capacidade de aumentar o rendimento de várias gramíneas economicamente importantes como trigo, sorgo, milho e tomate (da família Solanaceae), em solos e regiões climáticas diferentes (PATRIQUIN *et al.*, 1983; BASHAN *et al.*, 1991; OKON; VANDERLEYDEN, 1997; BASHAN; DE BASHAN, 2002; HUNGRIA *et al.*, 2010). Trabalhos recentes mostraram que *A. brasilense* também pode exercer efeitos benéficos inibindo a proliferação de patógenos, fixando nitrogênio em associação com plantas e induzindo a expressão de sistemas de captação de amônio em plantas (BASHAN; DE BASHAN, 2002; BASHAN; HOLGUIN

e DE BASHAN, 2004; RUSSO *et al.*, 2008).

O uso de inoculantes contendo *Azospirillum* poderia ajudar na redução do uso de fertilizantes químicos diminuindo os custos e a contaminação causada por fertilizantes nitrogenados (HUNGRIA *et al.*, 2010). Seu uso como biofertilizante já foi aprovado no Brasil pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para as culturas de milho e trigo.

A inoculação de *A. brasilense* permite a redução de cerca de 50% do fertilizante nitrogenado, mantendo a mesma produtividade. Somente no Brasil, isto corresponde a cerca de 52 kg de N/ha em 14,1 milhões de hectares para o milho e cerca de 35 kg de N/ha em 2,4 milhões de hectares para o trigo, gerando uma economia de aproximadamente US\$ 1,2 bilhões/ano. Portanto, o uso de inoculantes contendo *Azospirillum* pode contribuir para a meta de redução do uso de fertilizantes químicos (HUNGRIA *et al.*, 2010).

Devido à grande amplitude de efeitos benéficos induzidos pela inoculação de *Azospirillum*, vários países já utilizam *A. brasilense* como inoculante para gramíneas e outras culturas gerando ganhos de produtividade de até 30% (OKON; ITZIGSOHN, 1995).

1.3 TECNOLOGIA DE INOCULANTES

O elemento nitrogênio é um dos fatores limitantes para o desenvolvimento de plantas (DIXON; KAHN, 2004), e também o mais caro dos fertilizantes agrícolas (PEDROSA, 1987). De forma geral, nenhum vegetal é capaz de utilizar diretamente o nitrogênio atmosférico, sendo necessário o uso de fertilizantes nitrogenados ou a presença de microrganismos diazotróficos, tais como *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae*, que convertam o nitrogênio atmosférico a amônia e o disponibilizem para o vegetal.

A utilização de fertilizantes nitrogenados não só encarece os custos da produção agrícola, como também acarreta diversos danos ecológicos, uma vez que cerca de 50% do total de fertilizantes aplicados é perdida durante os processos de chuvas, erosões e ainda atividades bacterianas (PEDROSA, 1987). Entre os danos

causados ao meio ambiente pelo uso de fertilizantes nitrogenados incluem-se eutrofização de rios e lagos, acidificação do solo e emissão de óxidos de nitrogênio na atmosfera (DIXON; KAHN, 2004).

Além dos danos diretos causados ao solo durante a utilização de fertilizantes nitrogenados, no processo de produção destes, ocorre uma demanda de grandes quantidades de energia, normalmente oriunda da utilização de combustíveis fósseis, o que acarreta no aumento da emissão de dióxido de carbono, poluindo a atmosfera. Uma alternativa ao uso de fertilizantes químicos é a exploração da fixação biológica de nitrogênio por bactérias associadas às culturas de gramíneas (LADHA; REDDY, 2003; WU *et al.*, 1995).

A Rede de Laboratórios para a Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola (RELARE) é de fundamental importância no cenário agrícola brasileiro, tendo como base a produtividade sustentável associada à melhoria ou manutenção da qualidade ambiental. Seu papel é histórico e decisivo para o avanço da legislação sobre inoculantes microbianos. Entre os objetivos da RELARE destaca-se a congregação de pesquisadores e produtores/importadores de inoculantes microbianos de interesse agrícola no Brasil (<http://www.cnpso.embrapa.br/relare>). Unindo os esforços das entidades de pesquisa e das empresas produtoras de inoculante em torno de objetivos comuns, a tecnologia da Fixação Biológica de Nitrogênio evoluiu de forma mais organizada e rápida, possibilitando que o Brasil se tornasse o país com maior uso de inoculantes do mundo.

O conjunto existente hoje, desde a seleção e recomendação de estirpes para uso em inoculantes, novos padrões de qualidade de inoculantes, pesquisas em rede nacional, sugestões de legislação, até protocolos de experimentação agrícola têm saído das reuniões do grupo de pesquisadores e de empresas nos encontros da RELARE. Também participam de forma ativa destas reuniões pesquisadores e empresas da Argentina e do Uruguai, pois estes dois países exportam inoculantes para o Brasil.

Uma das propostas da RELARE foi a criação de um Fundo de Apoio à Pesquisa (FAPANPII), ideia apoiada pela Associação Nacional dos Produtores e Importadores de Inoculantes (ANPII), que consiste em uma quantia sobre cada dose de inoculante vendido no Brasil. Esse fundo já tem financiado várias pesquisas,

ajudou na manutenção do Banco de Estirpes, onde são mantidas, catalogadas e distribuídas as estirpes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, sendo o centro de referência e o laboratório oficial de análises dos inoculantes comercializados no país.

No início dos anos 80, foi elaborada pelo Ministério da Agricultura a primeira legislação, Lei Nº 6.894, de 16 de dezembro de 1980 (Anexo 1), exigindo que as empresas produtoras tivessem uma série de equipamentos mínimos necessários para a produção do insumo. A concentração mínima era de 100 milhões de bactérias por grama no momento da produção e de 10 milhões no final do prazo de validade. Em 10 de dezembro de 2013, a Lei Nº 12.890 (Anexo 2) foi elaborada para complementação de uma legislação mais adequada sobre o assunto. Em 14 de janeiro de 2004, o Decreto Nº 4.954 desta mesma Lei dispõe sobre a inspeção e fiscalização da produção e do comércio de fertilizantes, corretivos, inoculantes ou biofertilizantes destinados à agricultura (<http://www.anpii.org.br>).

Desta maneira, o inoculante é um material com uma formulação contendo uma ou mais espécies e/ou estirpes de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BASHAN, 1998). Estas bactérias são microrganismos que beneficiam a planta por colonizar a superfície de raízes, rizosfera, filosfera e tecidos internos das plantas (HUNGRIA, 2011). Aproximadamente 50 milhões de toneladas de NH_4^+ por ano são fixados por bactérias associadas a leguminosas de importância agrícola. Adicionalmente, 3 a 5 milhões de t de amônio são produzidas por bactérias associadas a leguminosas em ecossistemas naturais (GRAHAM; VANCE, 2003). Na Tabela 2, a fixação de nitrogênio é comparada entre *Azospirillum* e *Rhizobium* evidenciando que os mecanismos entre estes dois grupos são diferentes, porém são de igual importância para a planta.

Tabela 2. COMPARAÇÃO ENTRE RIZÓBIOS E BACTÉRIAS DE VIDA LIVRE NA FUNÇÃO DE FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO.

Grupo dos rizóbios	Grupo de vida livre
A bactéria não fixa nitrogênio sem se associar com a planta	A bactéria fixa nitrogênio mesmo sem estar associada à planta
As bactérias penetram na planta e formam nódulos	As bactérias penetram na planta mas não formam nódulos
Para fixar nitrogênio, há a necessidade da formação de nódulos	A fixação de nitrogênio independente da formação de nódulos
A planta tem um papel fundamental na	A planta tem um papel menos importante na

regulação do funcionamento dos nódulos	regulação da associação
---	--------------------------------

O desenvolvimento de um inoculante eficaz requer a integração de processos físicos, químicos e biológicos. Os parâmetros biológicos incluem a seleção de uma bactéria promotora de crescimento vegetal eficiente que exiba uma alta densidade populacional (STEPHENS; RASK, 2000) de maneira a sobreviver e tornar-se disponível para a planta (BASHAN, 1998). A inoculação de PGPR é um método promissor na agricultura com papel importante e os efeitos esperados incluem fixação de nitrogênio, proteção de diversas culturas, biocontrole de doenças, melhoramento na absorção de minerais e efeitos nutricionais, bem como hormonais (OKON; ITZIGSOHN, 1995; LASLO *et al.*, 2012; PICCININ *et al.*, 2013).

Uma grande quantidade de nitrogênio é incorporada no sistema solo/planta a partir da atmosfera, sendo a fixação biológica de nitrogênio (FBN) a maior responsável por esta transferência. A importância da FBN na agricultura é bem exemplificada pela soja, da família Fabaceae, cultura com grandes necessidades de nitrogênio e cerca de 24 milhões de hectares semeados em todo o país. Para produzir 1.000 kg de grãos a soja, por seu elevado teor de proteína, necessita de cerca de 80 a 100 kg de nitrogênio. Assim, para os 24 milhões de hectares da cultura, presumindo uma produção de 3.000 kg/ha, são necessários 6 milhões de t de nitrogênio supridos pela FBN, o equivalente a cerca de 13 milhões de t de ureia. Atualmente, a soja não recebe fertilizantes nitrogenados, somente inoculação com *Bradyrhizobium* spp., o que representa uma economia anual de mais de US\$ 2 bi para o Brasil. A 26 ilustra a diferença entre a raiz de soja não inoculada e inoculada. Segundo a Embrapa, no feijoeiro, há a aplicação de *Rhizobium tropici*, dispensando o uso de fertilizante e dobrando a produção (<http://www.embrapa.br>).

Nos anos de 2001 a 2004, o aumento nas vendas de inoculante acompanhou o crescimento da área plantada com soja. Em 2005 ocorreu a crise na agricultura a qual levou os agricultores a abandonarem muitas tecnologias. Naquele ano a área de soja aumentou, mas houve uma queda acentuada no uso de inoculante.

Segundo dados da ANPIL e IBGE/CONAB, em 2005 houve uma queda de 30,5% no uso de inoculantes em relação a 2004, enquanto a área de soja cresceu 8,4%, respectivamente (Figura 4). Já em 2006 houve outra queda brusca no consumo de inoculante, caindo as vendas em mais 28%, em relação a 2005,

enquanto a área de soja diminuiu apenas 5,7%.



Figura 3. RAÍZES DE SOJA.

(A) Raiz não-inoculada com *Bradyrhizobium* sp. É possível ver que há poucas raízes secundárias e poucos nódulos. (B) Raiz inoculada com *Bradyrhizobium* sp. É possível comparar com a imagem A que o número de nódulos e raízes secundárias aumenta consideravelmente.

FONTE: <http://www.grupocultivar.com.br/site/content/noticias/?q=23577> / <http://www.agrolink.com.br/culturas/soja/caracteristicas.aspx>

A partir de 2006 a área de soja estabilizou-se até 2009, em torno dos 21 a 22 milhões de hectares, com mínimas variações, enquanto o inoculante iniciou um constante aumento em seu uso nas lavouras.

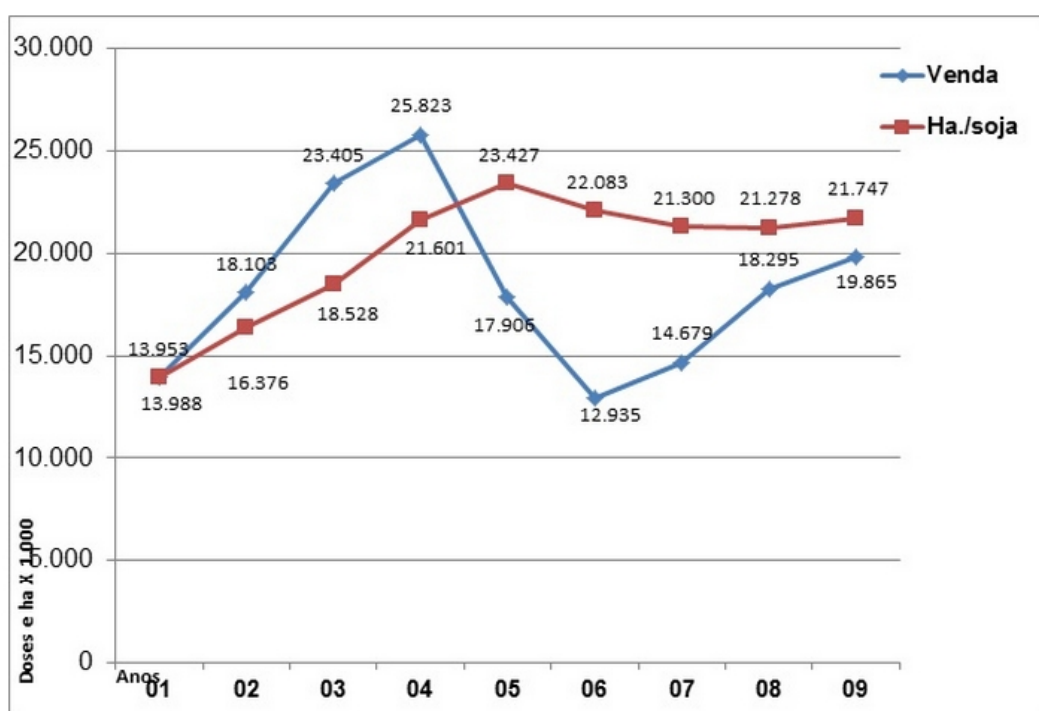


Figura 4. COMPARAÇÃO ENTRE VENDAS DE INOCULANTES* E ÁREA DE SOJA PLANTADA**.

*FONTE: Dados estatísticos da ANPII; **FONTE: IBGE/CONAB (Instituto Brasileiro De Geografia e Estatística/Companhia Nacional de Abastecimento).

A fixação de nitrogênio microbiológica natural é menor para culturas de gramíneas, requerendo suplementação com fertilizantes nitrogenados (PICCININ *et al.*, 2011). O primeiro inoculante para gramíneas, desenvolvido pela Embrapa, foi

para a cana-de-açúcar, com cinco estirpes isoladas da própria cana-de-açúcar, sendo elas: *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Azospirillum amazonense* e *Burkholderia tropica*. A economia chega a 50 mil toneladas de fertilizantes nitrogenados a menos em 1,2 milhões de hectares, sem diminuir a produtividade. No norte do Brasil, o custo de produção do milho reduziu em 7,5%, em números reais, R\$ 300 por hectare (<http://www.embrapa.br>). Neste caso, a seleção de estirpes de bactérias mais eficientes na promoção do crescimento vegetal tem sido objeto de intensos estudos (HUNGRIA *et al.*, 2010; OKON; ITZIGSOHN, 1995).

Cavallet e colaboradores (2000) demonstraram a eficiência de bactérias diazotróficas em associação com gramíneas e propuseram o uso de um produto comercial a base de *Azospirillum* sp. A produtividade de grãos de milho foi aumentada de 5.211 kg/ha para 6.067 kg/ha, ou seja, aumento de 17% e o comprimento médio das espigas foi de 13,6 para 14,4 cm, aumento de 6%. A aplicação de nitrogênio na semeadura e/ou em cobertura, não causou efeito sobre a produtividade do milho. A Figura 5 mostra a raiz de milho sob o efeito de inoculação com *Azospirillum* sp.

Cada parte, dentro da cadeia do inoculante deve trabalhar com o máximo de qualidade, visando a obtenção de um resultado altamente satisfatório em todo o processo: a seleção de estirpes é fundamental, a produção de inoculantes eficazes é indispensável, uma divulgação acessível da tecnologia e de seus benefícios, uma legislação moderna e compatível com a tecnologia, uma fiscalização intensiva e o uso da maneira correta por parte do agricultor - o elo final da cadeia.

Desta forma, os inoculantes se firmam cada vez mais como um insumo indispensável para a cadeia produtiva de leguminosas e gramíneas, constituindo-se em um elo importante para o Brasil manter seu elevado nível de competitividade na produção de grãos (<http://www.anpii.org.br>).



Figura 5. RAÍZES DE MILHO.

Planta lado esquerda é visto pouca raiz e poucas folhas no caule, cor verde menos intensa. Planta lado direita é visível o aumento no número de raízes e de folhas no caule, crescimento mais vigoroso com cor verde mais intensa.

FONTE: <http://www.agrolink.com.br/noticias/NoticiaDetalhe.aspx?codNoticia=94619>

1.4 MALDI-TOF MS

A proteômica é uma abordagem que explica a informação contida nas sequências genômicas por observação simultânea de um grande número de proteínas em termos de estrutura, função e controle de vias e processos biológicos (AEBERSOLD; GOODLETT, 2001). A espectrometria de massa (do inglês “*mass spectrometry* - MS”) é uma ferramenta fundamental nesses experimentos, utilizada para identificar e buscar proteínas (ALM *et al.*, 2006). É ideal para a determinação exata da massa molecular de biopolímeros e medidas de pesos moleculares são empregados rotineiramente na análise quantitativa e qualitativa de macromoléculas (KRISHNAMURTHY *et al.*, 1996; BAKHTIAR; NELSON, 2001).

Anhalt e Fenselau (1975) foram os primeiros a propor a identificação de

bactérias através da espectrometria de massa para uma rápida caracterização de patógenos humanos. Na década de 1980, o desenvolvimento de técnicas de dessorção/ionização leve, tais como o “*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*” (MALDI-TOF MS) e “*Eletrospray Ionization Mass Spectrometry*” (ESI MS), tornou possível a análise de biomoléculas complexas como carboidratos, lipídeos e, até, proteínas intactas (AEBERSOLD; GOODLETT, 2001; TANAKA; FENN, 2002; SCHILLER *et al.*, 2004; CARBONNELLE *et al.*, 2011). Mais tarde, pôde ser aplicada para produzir perfis de proteínas através de extratos celulares purificados e também diretamente da superfície de células intactas de bactérias (CLAYDON *et al.*, 1996; HOLLAND *et al.*, 1996; KRISHNAMURTHY *et al.*, 1996; CARBONNELLE *et al.*, 2007, 2011; CROXATTO *et al.*, 2012; BISWAS; ROLAIN, 2013).

Holland *et al.* (1996) e Claydon *et al.* (1996) foram os primeiros a desenvolver uma técnica de identificação de bactérias através do MALDI-TOF MS com sucesso. O esquema da Figura 6 mostra simplificada o funcionamento do espectrômetro de massa MALDI-TOF. Células da amostra a ser identificada são lisadas para liberar as proteínas intracelulares, são espotadas em placas de aço sob uma solução de matriz orgânica. A adição desta matriz proporciona a co-cristalização da amostra, o tamanho e a intensidade dos picos das moléculas depende da matriz escolhida. Os resultados são então coletados eletronicamente e são convertidos de medida de TOF para valores massa/carga (m/z). As massas de proteínas são registradas como picos distintos que juntos formam um conjunto de espectros, os *fingerprints*, caracterizando a amostra bacteriana (ZIEGLER *et al.*, 2012; CANTÚ *et al.*, 2008). Muitos trabalhos utilizando MALDI-TOF MS para identificação de microrganismos tem focado em demonstrar que a reprodutibilidade de espectros de massa pode ser obtida usando células inteiras e desenvolvendo algoritmos para interpretação e comparação destes espectros (BISWAS; ROLAIN, 2013).

A identificação de bactérias por espectrometria de massa apresenta as seguintes vantagens: (I) não está restrita a marcadores pré-específicos como a detecção molecular por anticorpos, oligonucleotídeos iniciadores de DNA ou sondas que se ligam a alvos pré-determinados e especificados; (II) é rápida - em um experimento desde o preparo da amostra até o resultado final requer alguns

minutos, enquanto que pelo método tradicional microbiológico são necessários dias;

Espectrômetro de massa MALDI TOF-MS

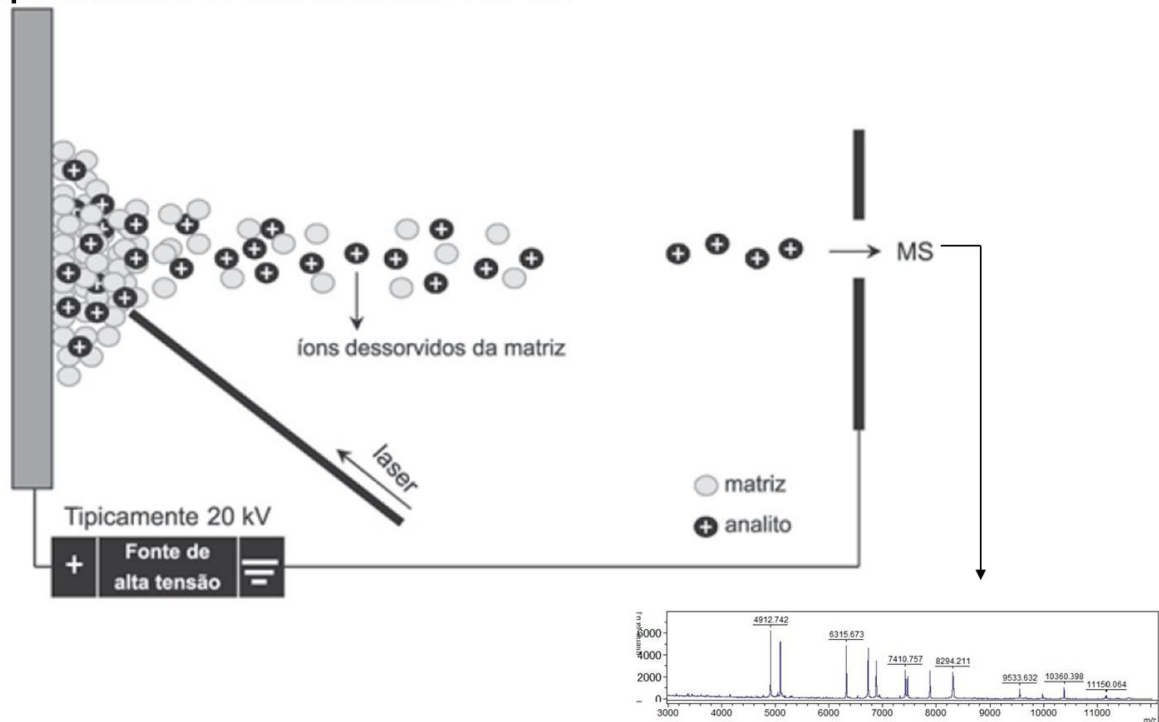


Figura 6. ESQUEMA TÉCNICO DO FUNCIONAMENTO DE MALDI-TOF MS.

FONTE: CANTÚ *et al.*, 2008.

(III) é sensível - sendo possível gerar sinais de detecção de uma amostra contendo menos de 10^4 células de microrganismos; (IV) é precisa - a variedade de amostra em estoque, o modo de preparo das amostras e seus diferentes ambientes podem ser diferenciados em instrumentos de MS; (V) possui baixo custo para identificação e caracterização precisa de gênero, espécie e até mesmo estirpe de microrganismos. Diante disso, consiste em uma alternativa para laboratórios convencionais de bioquímica, podendo ser aplicada por várias áreas como diagnóstico médico, biodefesa, segurança nacional, monitoramento ambiental, manejo agrícola, segurança no trabalho, controle de qualidade ambiental e alimentício, além da identificação de microrganismos (CLAYDON *et al.*, 1996; DEMIREV *et al.*, 1999; CARBONNELLE *et al.*, 2007; DEMIREV; FENSELAU, 2008; VELOO *et al.*, 2008; CROXATTO *et al.*, 2012; KLIEM; SAUER, 2012).

Como o MALDI-TOF MS baseia-se em análises fenotípicas, ou seja, as diferentes condições de crescimento como meios de cultura, tempo de incubação, pH, temperatura, métodos de extração química, entre outros, podem alterar o perfil de espectros dos microrganismos, a técnica precisa de um protocolo padrão e

atualização constante dos bancos de dados de espectros múltiplos de espécies bem caracterizadas (CARBONNELLE *et al.*, 2007, 2011; KLIEM e SAUER, 2012; BISWAS; ROLAIN, 2013). VAN VEEN; CLAAS e KUIJPER (2010) desenvolveram um estudo com 980 isolados de interesse clínico com análise em MALDI-TOF MS, 92% dos isolados foram identificados corretamente em nível de espécie comparado com 83,1% de isolados identificados por métodos convencionais. Sendo assim, os pesquisadores concluíram que métodos convencionais resultaram em mais de 1,6% de erro na identificação em nível de gênero comparado com o erro de 0,1% do MALDI-TOF MS. Entretanto, Dingle e Butler-Wu (2013) afirmam que a reprodutibilidade dos picos não é afetada por meios de cultura, condições de crescimento, ou outros, porque na faixa de 2 a 20 kDa de detecção no MALDI TOF MS predominam picos de proteínas ribossomais e a expressão destes genes não altera sob diferentes condições de cultivo.

Desde o final da década de 1990, houve um aumento significativo de publicações relacionadas à identificação de microrganismos pelo MALDI-TOF devido ao sucesso da técnica em identificar bactérias, fungos e vírus. A identificação de microrganismos é baseada em duas abordagens: (I) comparação de espectros de massa com um banco de dados – são gerados espectros únicos de células intactas ou de extratos celulares, e depois comparados com bibliotecas de *fingerprint* para estirpes referência disponíveis comercialmente. É conveniente desenvolver bancos de dados específicos contendo picos únicos e conservados que colaborem na identificação de espécies e subespécies (CARBONNELLE *et al.*, 2007; CROXATTO *et al.*, 2012; KLIEM; SAUER, 2012); (II) equivalência de massas de biomarcadores com banco de dados de proteoma – a massa do biomarcador é associada com um microrganismo desconhecido e, então, são identificados por uma massa molecular de proteína correspondente no espectro com uma massa molecular de proteína prevista de um genoma sequenciado (DEMIREV *et al.*, 1999). Este método supõe que a maioria das biomoléculas de extratos celulares inteiros observados acima de 4.000 *m/z* são proteínas. Porém, esta aplicação é limitada aos microrganismos que possuem seu genoma sequenciado (CROXATTO *et al.*, 2012).

A maioria das espécies representadas nos bancos de dados são aquelas de interesse clínico. Entretanto, a atenção no monitoramento da população microbiana em diversos ambientes vem aumentando por conta das diferentes esferas de

interesse humano, tais como agrícola, ecológica, veterinária, análise de alimentos e pesquisa básica (KOUBEK *et al.*, 2012; KRÁSNÝ; HYNEK e HOCHÉL, 2013), por isso o interesse em expandir os bancos de dados para espécies microbianas que não sejam patógenos humanos. Com isso, o MALDI-TOF MS abre uma nova maneira para estudos ecológicos e de diversidade, analisando grandes populações de isolados e permitindo a diferenciação de estirpes, espécies e gêneros. Trabalhos recentes demonstram o potencial de aplicação na identificação de rizóbios de crescimento rápido e lento (FERREIRA *et al.*, 2011; ZIEGLER *et al.*, 2012; SÁNCHEZ-JUANES *et al.*, 2013), bactérias fermentadoras de vinagre (ANDRÉS-BARRAO *et al.*, 2013), sub-grupos do gênero *Frankia*, que fixam nitrogênio (HAHN *et al.*, 2011), caracterização de *Enterococcus* em águas contaminadas (GIEBEL *et al.*, 2008) e caracterização de bactérias anaeróbias não patogênicas (VELOO *et al.*, 2008).

Stets e colaboradores (2013), num estudo de diversidade bacteriana de isolados de trigo, mostraram que é possível a identificação e diferenciação de estirpes de bactérias do gênero *Azospirillum* através da técnica de MALDI-TOF (Figura 7). Também foi constatada a diferenciação dos gêneros *Pseudomonas* sp., *Pantoea* sp., *Acinetobacter* sp. e *Enterobacter* sp.

A espectrometria de massa em conjunto com a cromatografia e a bioinformática é a tecnologia que mais cresce na era pós-genômica, alimentando grandes avanços nesta área (DEMIREV; FENSELAU, 2008).

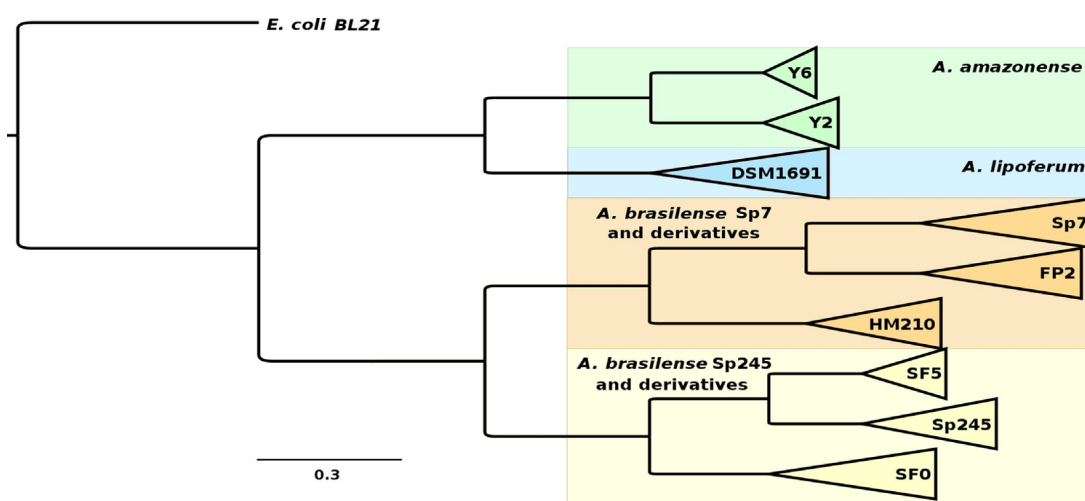


Figura 7. DENDROGRAMA BASEADO EM ESPECTROS GERADOS EM MALDI-TOF MS DE CÉLULAS INTEIRAS POR ESPÉCIES DE *Azospirillum* E ESTIRPES REFERÊNCIA. *A. brasilense* estirpes Sp7, Sp245 (tipo selvagem), FP2, HM210 (derivado de Sp7), SF5 e SF0 (derivados de Sp245); *A. amazonense* estirpes Y2 e Y6 (tipo selvagem); *A. lipoferum* estirpe DSM 1691.

FONTE: STETS *et al.*, 2013.

2. JUSTIFICATIVA

Atualmente, o controle de qualidade de inoculantes é padronizado pela Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola (RELARE, 2007; Anexo 3), sede na Embrapa Soja, Londrina – PR. O controle de qualidade de inoculantes é realizado pela contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) em meios semi-seletivos para a verificação do número de células viáveis dos microrganismos presentes no inoculante e revelar a presença de contaminantes que sejam fisio/morfológica e bioquimicamente distintos daqueles comercializados no inoculante. Os testes são baratos e de análise simples, porém são trabalhosos e não são capazes de distinguir espécies e estirpes, o que não garante a qualidade e o efeito controle de qualidade do produto.

Técnicas de identificação de microrganismos como análises fisiológicas, sorológicas, bioquímicas, genômicas, entre outras, são usadas rotineiramente neste tipo de identificação, mas são igualmente trabalhosos e demorados. Atualmente, a identificação e classificação de microrganismos através da espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF é comum, a qual se baseia no perfil de massa de biomoléculas característico de cada espécie/estirpe. A identificação pode ser determinada pela comparação de seu perfil de massa em um banco de dados comercial disponível, e, em alguns casos, também são usados bancos de dados públicos de sequências proteicas. A técnica de identificação por espectrometria de massa assemelha-se ao do sequenciamento do gene 16S rRNA na identificação e caracterização de bactérias mostrando que a técnica apresenta resolução em nível de espécie/estirpe superando, em muitos casos, o sequenciamento do gene 16S rDNA.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Aplicar a técnica de MALDI-TOF MS em conteúdo celular total na identificação de estirpes de bactérias promotoras do crescimento vegetal para o controle de qualidade de inoculantes comerciais usados em culturas agrícolas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar os perfis de massa para as estirpes referência usadas para produção de inoculantes;
- Aplicar os métodos qualitativos e quantitativos recomendados para controle de qualidade de inoculantes comerciais;
- Isolar bactérias de inoculantes comerciais para caracterização e identificação tanto de estirpes de bactérias usadas com inoculante quanto bactérias contaminantes;
- Identificar molecularmente estirpes de bactérias isoladas de inoculantes, por MALDI-TOF MS, amplificação de fragmento específico e/ou sequenciamento do gene 16S rRNA;
- Avaliar a capacidade da técnica de espectrometria de massa na identificação das bactérias e estabelecer as condições para seu uso no controle de qualidade dos inoculantes comerciais;
- Avaliar a capacidade da técnica para identificação de *Azospirillum brasilense* Ab-V5 e Ab-V6 presente em inoculantes comerciais após inoculação em raízes de milho inoculadas em condições controladas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 BACTÉRIAS E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

Foram utilizadas estirpes de *Azospirillum brasilense* e *Azospirillum lipoferum*, todas obtidas da coleção de cultura do Núcleo de Fixação de Nitrogênio da Universidade Federal do Paraná, *Herbaspirillum seropedicae* RAM4 e *Escherichia coli* BL21, cedidos gentilmente pela Prof. Dr. Rose Adele Monteiro e Prof. Dr. Luciano Fernandes Huergo respectivamente. A descrição de cada encontra-se na Tabela 3.

Tabela 3. ESPÉCIES E ESTIRPES DE BACTÉRIAS UTILIZADAS COMO REFERÊNCIA.

Espécie	Estirpe	Resistência	Referência
<i>Azospirillum brasilense</i>	Sp245	-	PATRIQUIN <i>et al.</i> , 1983
	FP2	Nal (10 µg/mL) Sm (80 µg/mL)	PEDROSA; YATES, 1984
	Ab-V5		HUNGRIA <i>et al.</i> , 2010
	Ab-V6		
	Ab-V7		
<i>Azospirillum lipoferum</i>	DSM 1691		REINHOLD <i>et al.</i> , 1986
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	RAM4	Km (100 µg/mL)	MONTEIRO <i>et al.</i> , 2008
<i>Escherichia coli</i>	BL21	-	STUDIER; MOFFATT, 1986

Para recuperação dos estoques de *A. brasilense* e *A. lipoferum*, as estirpes foram inoculadas em NFbHPN lactato (MACHADO *et al.*, 1991) sólido com seus respectivos antibióticos por 2 dias a 30 °C. *Herbaspirillum seropedicae* RAM4 foi cultivado em NFbHPN malato sólido (KLASSEN *et al.*, 1997) por um dia a 30 °C. *Escherichia coli* BL21 foi plaqueada em meio LA por 1 dia a 37 °C.

Estoques das bactérias foram preparados centrifugando-se 1 mL da cultura saturada por 1 min a 12.000 *g*. O sedimento de células obtido foi ressuspenso em 1 mL de glicerol 50% e conservado a -20 °C. As células também foram mantidas em meio sólido a 4 °C.

Tabela 4. INOCULANTES COMERCIAIS CONTENDO *Azospirillum brasilense*.

Empresa	Produto	Formulação	Lote	Composição (estirpe)	Fabricação	Validade	Concentração (bac/mL)	Recomendação
Inoc Bras	Axion Pluz AZ	líquido	692073	Ab-V5 e Ab-V6	13/03/2012	18 meses	3x10 ⁸	milho/trigo
Ballagro Agro Tecnologia	Hober Azos	líquido	862137	Ab-V5 e Ab-V6	16/05/2012	18 meses	3x10 ⁸	milho/trigo
Simbiose	Simbiose Maiz	líquido	078004201312000	Ab-V5 e Ab-V6	09/2013	6 meses	5x10 ⁸	milho/trigo
Nitro 1000	Nitro 1000 Gramíneas	líquido	1100613	Ab-V5 e Ab-V6	03/07/2012	18 meses	2x10 ⁸	milho/trigo
Total Tecnologia	Azototal	líquido	031912	Ab-V5 e Ab-V6	NI	NI	2x10 ⁸	milho/trigo
Stoller do Brasil	Masterfix Gramíneas	líquido	25047-11211	Ab-V5 e Ab-V6	05/12/2011	NI	2x10 ⁸	milho/trigo/arroz
Nitral Urbana	Gelfix Gramíneas	líquido	D09803Y039	Sp245	08/02/2013	6 meses	1.666.666 bac/semente	milho

Inoculantes descritos em ordem aleatória. Todas as informações contidas na tabela foram retiradas das embalagens dos produtos.

(NI) não informado na embalagem.

4.2 CONTROLE DE QUALIDADE DE INOCULANTES COMERCIAIS

Azospirillum brasilense Ab-V5, Ab-V6, Ab-V7 e Sp245 são as estirpes utilizadas em inoculantes comerciais. As empresas que produzem esses inoculantes e suas recomendações estão relacionadas na Tabela 4. Os inoculantes foram gentilmente cedidos para análises pelas empresas que os comercializam, sendo utilizados para o controle de qualidade a partir de métodos padronizados pela RELARE (2007; Anexo 3) e para o desenvolvimento de método baseado em espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF.

4.2.1 ISOLAMENTO E CONTAGEM DA POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS NO INOCULANTE

4.2.1.1 ISOLAMENTO E CONTAGEM DE *Azospirillum brasilense*

Os inoculantes contendo estirpes de *Azospirillum brasilense* passaram pelo processo de diluição seriada em solução salina 0,9%, de acordo com protocolo padronizado pela RELARE (2007; Anexo 3). Alíquotas de 100 µL das diluições 10^{-5} a 10^{-7} foram transferidas para placas de petri com os meios ágar-nutriente (NA), meio Dygs e meio BDA (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd.). Adicionalmente às análises foi incluído o meio NFbHPN lactato 3x sólido (DÖBEREINER; BALDANI e BALDANI, 1995), meio que contém o indicador de pH azul de bromotimol, seletivo para *Azospirillum*. Todos sem antibióticos, pelo método de espalhamento, em triplicata. Foram incubadas a 30 °C num período de 5 a 7 dias para posterior contagem de unidades formadoras de colônias (UFC).

4.2.1.2 CULTIVO DE ESTIRPES USADAS COMO REFERÊNCIA

As estirpes de *A. brasilense* FP2, Ab-V5, Ab-V6, Ab-V7 e Sp245, *A. lipoferum* DSM 1691 e *E. coli* BL21 foram cultivadas nos mesmos meios de cultura descritos no item 4.2.1.2, em duplicata biológica sem antibióticos a 30 °C por 5 dias. Para cada uma das diluições em duplicata, a análise por espectrometria de massa MALDI-TOF (ver abaixo) foi realizada em triplicata, totalizando 24 replicatas de cada estirpe, contendo as variações em: 4 meios de cultura x 2 replicatas biológicas x 3 replicatas técnicas.

4.2.1.3 CONTAMINAÇÃO ARTIFICIAL DE INOCULANTE

Foi utilizada a estirpe RAM4 de *Herbaspirillum seropedicae* para teste de contaminação artificial de inoculante comercial. A bactéria foi cultivada em 5,0 mL de NfbHPN malato líquido + 5,0 µL de canamicina (Km) 100 µg/mL a 30 °C por 16 h ou até atingir o número de células por mL igual 1×10^8 . Foi feita diluição seriada e utilizada três alíquotas de 10 µL das concentrações 10^{-3} a 10^{-8} para contagem de células pela técnica de micro-gota. O restante do volume foi misturado com 5,0 mL de inoculante (v/v), deixado incubar por 1 h no fluxo laminar em temperatura ambiente com o frasco fechado, e então feita a diluição seriada para o protocolo da RELARE (Anexo 3).

4.3 TÉCNICA DE ESPECTROMETRIA DE MASSA

4.3.1 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE NO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS MALDI-TOF

Colônias isoladas das estirpes de referência e provenientes de inoculantes comerciais foram analisadas por espectrometria de massas de tipo MALDI-TOF,

determinado por Stets *et al.* (2013a). As células foram raspadas das placas e, em seguida, ressuspensas em 1 mL de água ultrapura e centrifugadas por 2 min a 14.500 rpm. Esta etapa foi repetida duas vezes. O precipitado celular foi ressuspenso com 20 µL de ácido fórmico 70% e 20 µL de acetonitrila para lise celular. O lisado foi centrifugado por 2 min a 14.500 rpm e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo.

Para obtenção dos espectros de massa, 1,0 µL do sobrenadante foi aplicado numa placa de MALDI (Bruker-Daltonics, Bremen, Alemanha) e deixado secar em temperatura ambiente por aproximadamente 10 min. Em seguida, foi aplicado o mesmo volume (1,0 µL) de matriz sobre o sobrenadante seco e novamente deixado secar a temperatura ambiente por aproximadamente 10 min. A matriz utilizada consistia de uma solução saturada contendo aproximadamente 10 mg/mL de α -ciano-4-ácido hidroxicinâmico (HCCA) em acetonitrila 50% e ácido trifluoroacético 2,5%.

4.3.2 ANÁLISE DAS AMOSTRAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA

As misturas de amostras e matriz secas foram processadas em espectrômetro de massa MALDI-TOF (Autoflex; Bruker Daltonics) equipado com um laser de nitrogênio, utilizando o software Flex Control v. 3.0 (Bruker Daltonics). Os íons positivos foram extraídos usando uma voltagem de aceleração de 20 kV no modo linear. Cada espectro resultou da soma dos íons obtidos de 1.000 pulsos do laser com etapas de 100 em 100 pulsos em diferentes pontos da amostra. A aquisição dos espectros foi realizada de forma manual com uma resolução mínima de 600 e analisados em uma faixa de relação massa/carga (m/z) de 2.000 a 20.000 utilizando como calibrante a mistura de insulina (5.734,51 m/z), ubiquitina I (8.565,76 m/z), apomio globina (16.952,27 m/z), insulina cadeia B oxidada (3.493,6513 m/z), ribonuclease A (13.700 m/z) e citocromo C (12.360,97 m/z) (Protein Calibration Standard I – Bruker Daltonics).

Os espectros obtidos foram processados utilizando o software FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics). A manipulação dos espectros e as análises foram realizadas

com auxílio do programa MS-Analyser (SANTOS *et al.*, 2012). Através deste software foi possível a extração das listas de picos de todos os espectros gerados. Foi escolhido aleatoriamente que os 14 primeiros picos de cada lista seriam utilizados nas análises.

As listas de picos (relação m/z) identificados para os espectros foram gravadas em arquivos identificados como *peak list* e submetidos a análise no programa Speclust (ALM *et al.*, 2006) *on line* (<http://bioinfo.thep.lu.se/speclust.html>). O programa compara um conjunto de espectros através da identificação de picos em comum observados entre dois espectros, atribuindo um *score* para cada par de picos em comum identificados. Para cada par de espectro comparado, um *score* geral foi atribuído através da soma dos *scores* para os picos em comum. Os *scores* gerais foram então ordenados, do maior para o menor, e usados para determinação do grau de identidade entre os espectros. Esta metodologia foi usada para simular uma busca, a partir de um espectro proveniente de uma cultura de bactéria “desconhecido” (espectro *query*), contra um banco de dados de espectros referência (espectros *subject*). Esta comparação permitiu identificar, no banco de dados, o(s) espectro(s) de maior identidade com o espectro *query*, possibilitando, em alguns casos, a identificação taxonômica das bactérias analisadas.

4.4 TÉCNICAS DE MANIPULAÇÃO DO DNA

4.4.1 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA REAÇÃO DA PCR A PARTIR DE CULTURAS

As colônias crescidas nos meios semi-seletivos foram repicadas em um novo meio de cultura para obtenção de maior quantidade de massa celular. Depois do crescimento, as culturas foram raspadas e diluídas em 1:50, fervidas a 96 °C por 10 min e imediatamente resfriadas em gelo. Após este tratamento, as amostras estavam prontas para serem usadas para reação de amplificação por PCR.

4.4.2 AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTO ESTIRPE-ESPECÍFICO

A amplificação de fragmento estirpe-específico para *Azospirillum brasilense* FP2/Ab-V5 utilizou alíquotas das culturas fervidas como fonte de DNA molde e os oligonucleotídeos iniciadores AzoR2.1 direto 5'-CGCCACCATGCGATCAA-3' e reverso 5'-GCATGCCCAGTACTGCAAGTC-3', desenhados por STETS (2013b) para amplificação de uma região estirpe-específica de *A. brasilense* FP2/Ab-V5 de 90 pb. A mistura da reação consistiu em: 2 µL de cultura fervida, 1 µL de tampão 10X DreamTaq (contendo 20 mM MgCl₂) (Thermo Scientific), 0,5 µL de dNTP (5mmol/L), 0,05 µL DreamTaq DNA Polymerase 5 U/µL (Thermo Scientific), 0,3 µL de cada oligonucleotídeo iniciador AzoR2.1 direto e reverso (10 pmol/µL) e 5,85 µL de água ultrapura para completar o volume de 10 µL. O seguinte ciclo de temperaturas foi usado no termociclador Mastercycler® (Eppendorf): 10 min a 95 °C, 30 ciclos de 30 s a 95 °C, 45 s a 60 °C, 45 s a 72 °C, e um ciclo final de extensão de 72 °C por 7 min. Após a reação de amplificação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% sob tampão BS 1X (borato de sódio 100 mM, 10 mM EDTA), coradas com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) por 15 min e fotografadas sob luz ultravioleta (302 nm) em transiluminador UV.

4.4.3 AMPLIFICAÇÃO DO GENE 16S rRNA POR PCR

Alíquotas das culturas fervidas foram utilizadas como molde nas reações de amplificação, utilizando o *kit* de PCR Fermentas. O sistema continha 5 µL de DNA template, 2,5 µL de solução tampão (PCR buffer 10x, *kit* PCR Fermentas), 0,75 µL de MgCl₂ (25 mmol/L), 1 µL de dNTP (5 mmol/L), 1 µL de Taq DNA polimerase (*kit* PCR Fermentas) (5U/µL), 3 µL dos oligonucleotídeos iniciadores Y1 5'-TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC-3' (YOUNG, 1991) e Y3 5'-TACCTTGTTACGACTTCACCCCAGTC-3' (10 pmol/ µL) (CRUZ *et al.*, 2001) e 8,75 µL de água ultrapura para completar 25 µL. O programa utilizado no termociclador

Mastercycler® (Eppendorf) consistiu de: 1 ciclo de 95 °C por 10 min; 30 ciclos de 30 s a 95 °C, 45 s a 62 °C e 1 min e 30 s a 72 °C; e um ciclo final de 72 °C por 7 min. Após a reação de amplificação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%, coradas com brometo de etídio (0,5 µg/mL) e fotografadas sob luz UV.

4.4.4 PURIFICAÇÃO DO PRODUTO AMPLIFICADO

O produto da amplificação foi purificado com o uso da reação enzimática simultânea de 0,66 µL de Exonuclease I (EXO I – 5,2 U/µL – Fermentas), 0,66 µL de Fosfatase Alcalina (SAP – 0,77 U/µL – Fermentas) e 0,68 µL de água ultrapura para um volume de 25 µL do material amplificado. A reação foi incubada durante 60 min a 37 °C, seguido de inativação das enzimas a 80 °C por 15 min.

4.4.5 SEQUENCIAMENTO DO GENE 16S rRNA DOS ISOLADOS

O sequenciamento foi realizado a partir de 3,0 µL do material amplificado e purificado, 0,5 µL do oligonucleotídeo iniciador Y1 (10 pmol), 3,0 µL de tampão Save Money (10% (v/v) com MgCl₂ 50 mM e 20% (v/v) de Tris-HCl pH 9,0), 1,0 µL de BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit e 2,5 µL de água ultrapura estéril para completar 10 µL de reação. A reação em termociclador foi realizada com o seguinte ciclo de temperaturas: 1 ciclo de 1 min a 96 °C; 25 ciclos de 15 s a 94 °C, 15 s a 62 °C, e 4 minutos a 60 °C.

Ao término da reação de sequenciamento, os produtos foram precipitados pela adição de 2,5 µL de Acetato de Amônio (7,5 M), 60 µL de etanol absoluto (Merck), 10 µL de água ultrapura estéril e centrifugados por 45 minutos a 14.500 rpm. O sobrenadante foi descartado e, logo após, adicionado 150 µL de etanol 70% e centrifugado novamente por 45 min a 14.500 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado seco em estufa a 37 °C.

Após secagem, o precipitado resultante foi ressuspenso em 3,0 µL de tampão de aplicação. As leituras de sequências foram obtidas em sequenciador automático Applied Biosystems® 3500 e 3500xL Genetic Analyzers.

4.4.6 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS

As sequências obtidas dos isolados foram comparadas contra o banco de dado “16S ribosomal RNA sequences (*Bacteria and Archaea*)” do *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), utilizando a ferramenta BLASTn (ALTSCHUL *et al.*, 1997) para identificação taxonômica das bactérias.

4.5 ENSAIO *in planta* COM MILHO

4.5.1 DESINFESTAÇÃO DA SUPERFÍCIE DAS SEMENTES DE MILHO

As sementes de milho (*Zea mays*) cultivar SHS-3031 (produto comercial de prateleira) passaram inicialmente por um processo de desinfestação, as quais permaneceram durante 20 min em solução de hipoclorito de sódio 6% (v/v) e Tween 20 0,1% (v/v), em seguida, em etanol 70% por 5 min. As sementes foram então lavadas 4 vezes com água destilada estéril por 1 min cada vez e tratadas com fungicida Vitavax-Thiram (0,005% m/v) por 2 horas. A quantidade das soluções seguiu a proporção de um mililitro para cada semente.

4.5.2 CULTIVO DE PLANTAS EM SISTEMA HIDROPÔNICO INOCULADOS COM *Azospirillum brasilense* Ab-V5 E INOCULANTE COMERCIAL

Após esterilização, as sementes foram transferidas para placas contendo ágar-água (1,0%). As placas foram enroladas em papel-alumínio e mantidas a 30 °C por três dias para germinação. As plântulas foram inoculadas com 1,0 mL de cultura por semente, na concentração de 10^8 unidades formadoras de colônias (UFC)/mL de *Azospirillum brasilense* Ab-V5 por 15 min, transferidas para tubos de ensaio (30 cm) contendo 30 mL de meio *Plant Medium* e 10 g de esferas de polipropileno. Os tubos foram incubados em câmaras de cultivo a 25 °C com período de luz de 12 h e 1.250 lux. Foi realizado um ensaio para *A. brasilense* Ab-V5 como controle positivo, e plântulas sem inóculo como controle negativo; e outro ensaio para o inoculante comercial contendo uma mistura de *A. brasilense*, estirpes Ab-V5 e Ab-V6, como controle positivo, e plântulas sem inóculo como controle negativo.

4.5.3 REISOLAMENTO DAS ESTIRPES DE *Azospirillum brasilense* DE RAÍZES DE MILHO INOCULADAS

O ensaio de colonização epifítica ou superficial foi realizado imediatamente após a inoculação, no 3º e 7º dias. As plantas foram coletadas, tiveram suas raízes cortadas e transferidas para tubos Falcon para pesagem. A massa de 1 g de raiz foi macerada em grau estéril em 9 mL de solução salina (NaCl 0,9%). A partir dos extratos foi realizada a diluição seriada (10^{-1} a 10^{-6}) para plaqueamento das diluições 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} e 10^{-6} , em triplicatas, em meio sólido NFbHPN lactato sem antibióticos e com os antibióticos ácido nalidíxico (Nal) 10 µg/mL e estreptomicina (Sm) 80 µg/mL, por 2 dias a 30 °C. Estas mesmas diluições foram inoculadas em meio semi-sólido NFbHPN lactato com azul de bromotimol (DÖBEREINER, 1995), em duplicatas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO DOS ESPECTROS DE ESTIRPES REFERÊNCIA

A identificação de bactérias por MALDI-TOF MS depende da comparação com padrões pré-determinados para estirpes referência. Sendo assim, inicialmente foram obtidos os espectros de massa para as estirpes referência *A. brasilense* Ab-V5, Ab-V6 e Ab-V7, usadas para a fabricação de inoculantes comerciais. Também foram gerados espectros de massas padrões de *A. brasilense* FP2 e *A. brasilense* Sp245 como estirpes ancestrais, *A. lipoferum* DSM 1691, representando uma segunda espécie de *Azospirillum* e *E. coli* BL21 como grupo externo.

As diferentes estirpes citadas na seção 4.2.1.2 do Material e Métodos foram cultivadas em diferentes meios de cultura e então processadas no espectrômetro de massa MALDI-TOF. Um total de 24 espectros para cada estirpe foi obtido e considera variações biológica e técnica nos perfis espectrométricos.

A partir dos espectros foram geradas tabelas de picos que permitiram a comparação entre *A. brasilense* FP2, *A. lipoferum* DSM 1691 e *E. coli* BL21 (Tabela 5) para diferenciação das espécies. Nenhum pico em comum foi encontrado entre *Azospirillum* spp. e *E. coli* BL21.

O pico de maior reprodutibilidade para *E. coli* foi o 5.380,5 *m/z* com 41,67%, seguido de 7.271,31 *m/z* com 29,17% e 9.534,2 *m/z* com 25%. A Figura 8 mostra os espectros representativos das três espécies. Nenhum pico em comum foi encontrado na comparação entre *A. brasilense* FP2 e *A. lipoferum* DSM 1691. Os picos de *A. brasilense* FP2 obtiveram boa reprodutibilidade entre os espectros: o pico de 7.294,51 *m/z* apresentou-se em 100% dos espectros, seguido de 7.360,94 *m/z* com 95,83%, 7.394,16 *m/z* com 91,67% e 7.435,20 *m/z* com 83,33%. Os picos de melhor reprodutibilidade de *A. lipoferum* DSM 1691 foram: 4.807,58 *m/z* e 3.126,80 *m/z* com 75%, 5.206,85 *m/z* com 66,67% e 6.281,03 *m/z* com 58,33%.

O dendrograma da Figura 9 foi gerada a partir de informações contidas na lista de picos dos espectros de estirpes-referência. Ficou demonstrado que *E. coli* BL21 separou do restante das referências como esperado, sendo um grupo externo.

A. brasilense e *A. lipoferum* separaram-se em duas ramificações por se tratarem de espécies diferentes. No ramo contendo estirpes de *A. brasilense*, a estirpe Ab-V7 agrupou próximo ao ancestral Sp245. As estirpes FP2 e Ab-V5 agruparam-se em ramos vizinhos, tendo uma origem e não havendo a mistura entre as estirpes. A estirpe Ab-V6, cujo ancestral é *A. brasilense* FP10, agrupou-se ao lado do ramo das estirpes FP2/Ab-V5.

Tabela 5. PICOS MAIS FREQUÊNTES OBSERVADOS EM ESPECTROS DE *Escherichia coli* BL21, *Azospirillum brasilense* FP2 e *Azospirillum lipoferum* DSM 1691.

<i>E. coli</i> BL21				<i>A. brasilense</i> FP2				<i>A. lipoferum</i> DSM 1691			
Pico ($\bar{X}_{m/z}$) ¹	D.P. ²	N ³	% ⁴	Pico ($\bar{X}_{m/z}$) ¹	D.P. ²	N ³	% ⁴	Pico ($\bar{X}_{m/z}$) ¹	D.P. ²	N ³	% ⁴
5380,50	2,6066	10	41,67	7294,51	0,000	24	100	4807,58	1,078	18	75,00
7271,31	0,9111	7	29,17	7360,94	0,000	23	95,83	3126,80	2,704	18	75,00
9534,20	1,5806	6	25,00	7394,16	1,376	22	91,67	5206,85	1,349	16	66,67
7282,25	1,5366	6	25,00	7435,20	0,843	20	83,33	6281,03	0,837	14	58,33
6253,19	0,5150	5	20,83	12779,30	2,087	19	79,17	4302,03	0,926	13	54,17
6408,97	1,9601	4	16,67	4131,42	0,000	19	79,17	9628,06	2,085	11	45,83
4362,06	1,1304	4	16,67	7853,26	0,213	18	75,00	4671,75	0,718	11	45,83
9546,97	0,3164	3	12,50	9523,26	0,138	17	70,83	4882,09	1,927	10	41,67
9224,49	1,5322	3	12,50	7403,15	0,639	17	70,83	6753,16	1,227	9	37,50
7309,53	0,6766	3	12,50	3146,89	0,811	14	58,33	7738,91	0,931	8	33,33
3786,21	0,3618	3	12,50	8252,47	0,000	11	45,83	6583,34	0,837	8	33,33
2325,11	0,5770	3	12,50	8226,44	0,000	10	41,67	9616,53	1,378	6	25,00
8334,62	0,9673	2	8,33	7444,78	0,639	10	41,67	6574,63	0,987	6	25,00
6313,52	0,2192	2	8,33	6925,19	0,000	10	41,67	6399,85	1,623	6	25,00

¹Pico identificado por seu valor de m/z médio ($\bar{X}_{m/z}$) entre os espectros onde foi observado; ²D.P., DESVIO PADRÃO; ³Nº de espectros em que cada pico foi observado; ⁴Porcentagem em relação ao total de espectros (n=24).

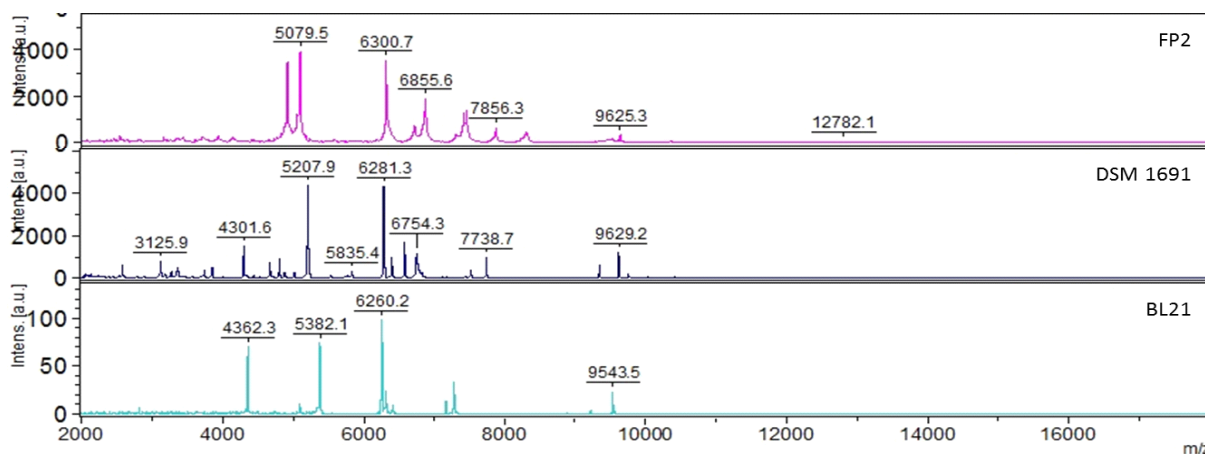


Figura 8. ESPECTROS DE MASSA EXEMPLIFICANDO OS PICOS ANALISADOS. FP2 - *A. brasilense* FP2, DSM 1691 - *A. lipoferum* DSM 1691, BL21 - *E. coli* BL21.

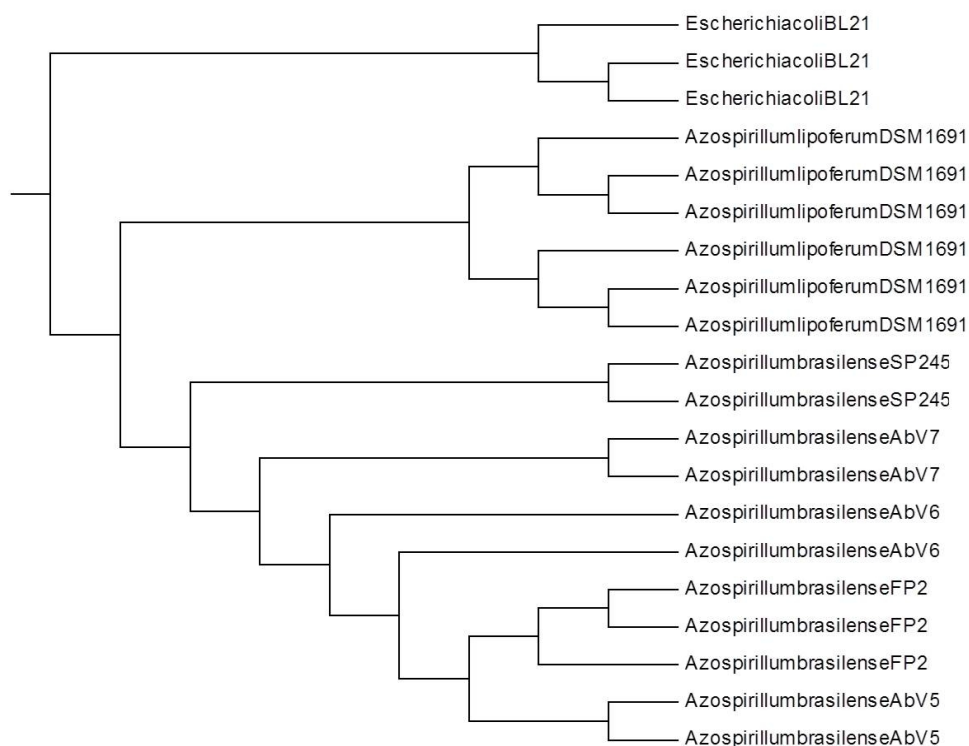


Figura 9. DENDROGRAMA DE ESTIRPES-REFERÊNCIA A PARTIR DE ESPECTROS DE MASSA.

Dendrograma gerado no MS Analyser a partir de lista de picos dos espectros de massa de estirpes-referência; as repetições técnicas e biológicas para cada estirpe estão representadas para mostrar a variação na técnica.

A Tabela 6 mostra a comparação de duas estirpes de *A. brasilense* de derivações distintas. Entre as estirpes FP2 e Sp245 existem dois picos em comum: 7.403 m/z com 70,83% e 29,17%, e 7.444 m/z 41,67% e 45,83%, respectivamente para as estirpes. A Figura 10 complementa as análises, certificando que os picos são diferentes visualmente.

Os resultados acima estão de acordo com Stets *et al.* (2013a) que conseguiram diferenciar espécies de *Azospirillum* sp. e estirpes de *A. brasilense* através da espectrometria de massa MALDI-TOF.

Os resultados da comparação entre estirpe ancestral e derivada de *A. brasilense* são apresentados em duas tabelas. A Tabela 7 mostra os picos de FP2 em comparação com os picos de sua estirpe derivada Ab-V5. Três picos em comum foram encontrados: 7.435 m/z com 83,33% e 38,33%, 7.403 m/z com 70,83% e 41,67%, e 7.444 m/z com 41,67% e 45,83%, respectivamente. A Figura 11 mostra os picos de FP2 e Ab-V5 que melhor representam as estirpes. Já a Tabela 8 compara os picos de *A. brasilense* Sp245 com a estirpe derivada Ab-V7.

Tabela 6. PICOS EXTRAÍDOS DE ESPECTROS DE *A. brasilense* FP2 E *A. brasilense* Sp245.

<i>A. brasilense</i> FP2				<i>A. brasilense</i> Sp245			
Pico ($\bar{X}_{m/z}$) ¹	D.P. ²	N ³	% ⁴	Pico ($\bar{X}_{m/z}$) ¹	D.P. ²	N ³	% ⁴
7294,51	0,000	24	100	4898,31	1,5343	19	79,17
7360,94	0,000	23	95,83	5079,32	1,7240	16	66,67
7394,16	1,376	22	91,67	9630,17	2,0911	13	54,17
7435,20	0,843	20	83,33	6860,24	1,8996	12	50,00
12779,30	2,087	19	79,17	7444,18	1,0159	11	45,83
4131,42	0,000	19	79,17	4809,18	1,6804	10	41,67
7853,26	0,213	18	75,00	6389,24	1,8900	8	33,33
9523,26	0,138	17	70,83	6304,52	1,1133	8	33,33
7403,15	0,639	17	70,83	7403,06	1,6641	7	29,17
3146,89	0,811	14	58,33	12764,10	2,0070	6	25,00
8252,47	0,000	11	45,83	5169,19	2,1363	6	25,00
8226,44	0,000	10	41,67	8286,29	1,5514	5	20,83
7444,78	0,639	10	41,67	9620,61	0,5808	4	16,67
6925,19	0,000	10	41,67	7849,44	1,1090	4	16,67

¹Pico identificado por seu valor de m/z médio ($\bar{X}_{m/z}$) entre os espectros onde foi observado; ²D.P., DESVIO PADRÃO; ³Nº de espectros em que cada pico foi observado; ⁴porcentagem em relação ao total de espectros (n=24).

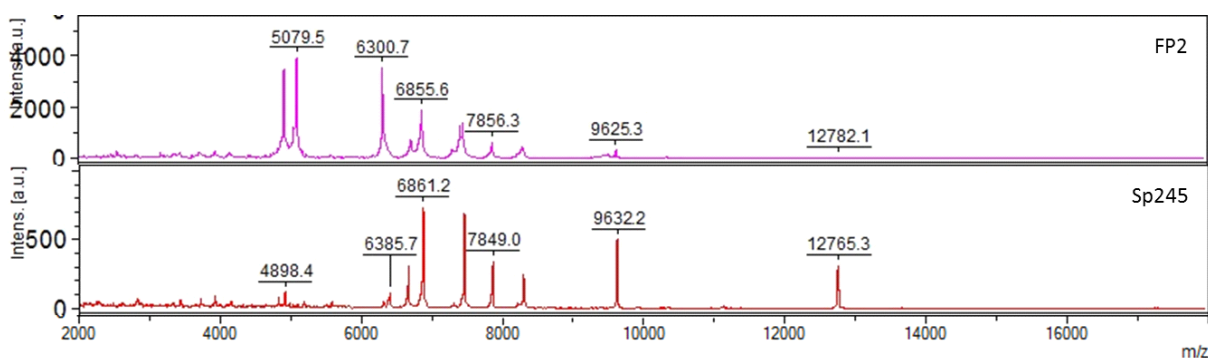


Figura 10. ESPECTROS DE MASSA ANALISADOS ESTIRPES DE *Azospirillum brasilense* FP2 E Sp245.

Foram identificados cinco picos semelhantes: 4.898 m/z com 79,17% e 83,33%, 5.079 m/z com 66,67% e 83,33%, 7.444 m/z com 45,83% e 37,50%, 7.403 m/z com 29,17% e 41,67%, e 8286 m/z com 20,83% e 37,50%, respectivamente. A Figura 12 mostra os picos de Sp245 e Ab-V7.

Assim, foi possível diferenciar *E. coli* BL21 das espécies do gênero *Azospirillum*, e diferenciar as estirpes da espécie *Azospirillum brasilense*. Resultado parecido foi observado por Ferreira e colaboradores (2011) que conseguiram diferenciar espécies e estirpes de *Rhizobium* sp., *Ensifer* sp. e *Shinella* sp. num

trabalho de identificação de rizóbios nodulantes.

Tabela 7. PICOS OBTIDOS EM ESPECTROS DE *A. brasilense* FP2 E DE SUA ESTIRPE DERIVADA *A. brasilense* Ab-V5.

<i>A. brasilense</i> FP2				<i>A. brasilense</i> Ab-V5			
Pico ($\bar{X}_{m/z}$) ¹	D.P. ²	N ³	% ⁴	Pico ($\bar{X}_{m/z}$) ¹	D.P. ²	N ³	% ⁴
7294,51	0,00000	24	100	6858,88	4,39471	19	79,17
7360,94	0,00000	23	95,83	4898,00	1,46189	17	70,83
7394,16	1,37587	22	91,67	6306,53	1,26583	14	58,33
7435,20	0,84322	20	83,33	5080,06	1,53228	14	58,33
12779,30	2,08708	19	79,17	7444,88	1,49456	11	45,83
4131,42	0,00000	19	79,17	7403,63	1,43956	10	41,67
7853,26	0,21314	18	75,00	9633,74	2,03257	8	33,33
9523,26	0,13818	17	70,83	5042,99	2,3728	8	33,33
7403,15	0,63859	17	70,83	12781	1,99811	7	34,33
3146,89	0,81089	14	58,33	7863,62	1,58283	7	35,33
8252,47	0,00000	11	45,83	6299,51	0,783312	7	36,33
8226,44	0,00000	10	41,67	8287,76	1,31086	6	37,33
7444,78	0,63870	10	41,67	7435,03	0,658726	6	38,33
6925,19	0,00000	10	41,67	6710,83	1,19109	6	39,33

¹Pico identificado por seu valor de m/z MÉDIO ($\bar{X}_{m/z}$) entre os espectros onde foi observado; ²D.P., DESVIO PADRÃO; ³Nº de espectros em que cada pico foi observado; ⁴porcentagem em relação ao total de espectros (n=24).

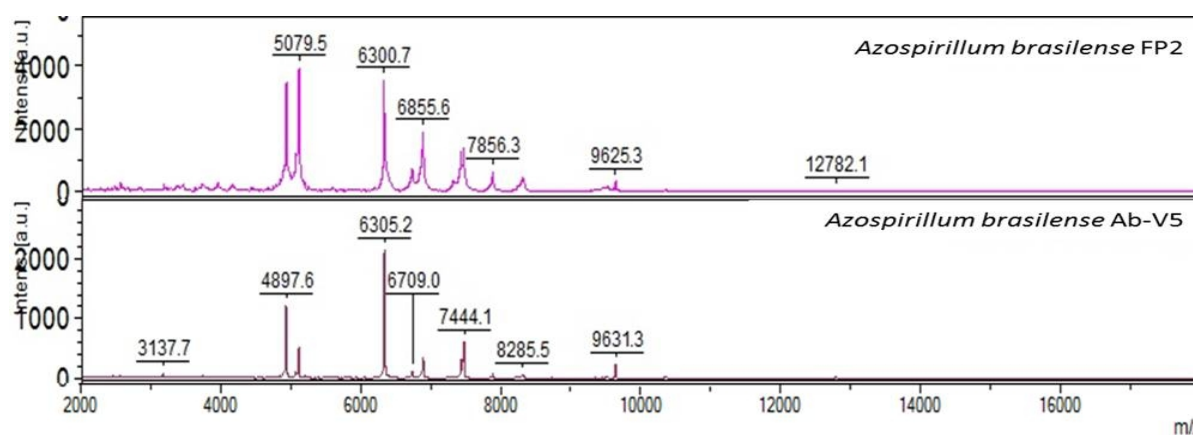


Figura 11. ESPECTROS DE MASSA ANALISADOS DE *Azospirillum brasilense* FP2 E Ab-V5.

Também foi feita a comparação de picos das estirpes Ab-V5, Ab-V6 e Ab-V7 de *A. brasilense*, estirpes utilizadas para a fabricação de inoculantes comerciais (Tabela 9). Foram encontrados sete picos em comum para as três estirpes. Ab-V5 e Ab-V6 apresentaram mais o pico 6.710 m/z com 39,33% e 20,83% em comum. Ab-

V5 e Ab-V7 apresentaram mais dois picos semelhantes, 5.042 m/z com 33,33% e 45,83%, e 8.287 m/z com 37,33% e 37,50%. Ab-V6 e Ab-V7 assemelharam-se em mais o pico 6.853 m/z com 25% e 37,50% de reprodutibilidade (Figura 13).

Tabela 8. PICOS OBTIDOS EM ESPECTROS DE *A. brasilense* Sp245 E DE SUA ESTIRPE DERIVADA *A. brasilense* Ab-V7.

<i>A. brasilense</i> Sp245				<i>A. brasilense</i> Ab-v7			
Pico ($\bar{X}_{m/z}$) ¹	D.P. ²	N ³	% ⁴	Pico ($\bar{X}_{m/z}$) ¹	D.P. ²	N ³	% ⁴
4898,31	1,5343	19	79,17	6302,8	3,4706	20	83,33
5079,32	1,7240	16	66,67	5079,6	1,4043	20	83,33
9630,17	2,0911	13	54,17	4898,0	1,1082	20	83,33
6860,24	1,8996	12	50,00	12766,5	3,0031	11	45,83
7444,18	1,0159	11	45,83	5042,6	1,3416	11	45,83
4809,18	1,6804	10	41,67	9633,5	1,4053	10	41,67
6389,24	1,8900	8	33,33	7403,8	1,0677	10	41,67
6304,52	1,1133	8	33,33	6862,1	0,9633	10	41,67
7403,06	1,6641	7	29,17	8287,3	1,8168	9	37,50
12764,10	2,0070	6	25,00	7444,9	0,7396	9	37,50
5169,19	2,1363	6	25,00	6853,9	1,3139	9	37,50
8286,29	1,5514	5	20,83	6652,1	1,4610	9	37,50
9620,61	0,5808	4	16,67	7849,4	0,8347	8	33,33
7849,44	1,1090	4	16,67	7435,1	1,0862	8	33,33

¹Pico Identificado por seu valor de m/z médio ($\bar{X}_{m/z}$) entre os espectros onde foi observado; ²D.P., DESVIO PADRÃO; ³Nº de espectros em que cada pico foi observado; ⁴porcentagem em relação ao total de espectros (n=24).

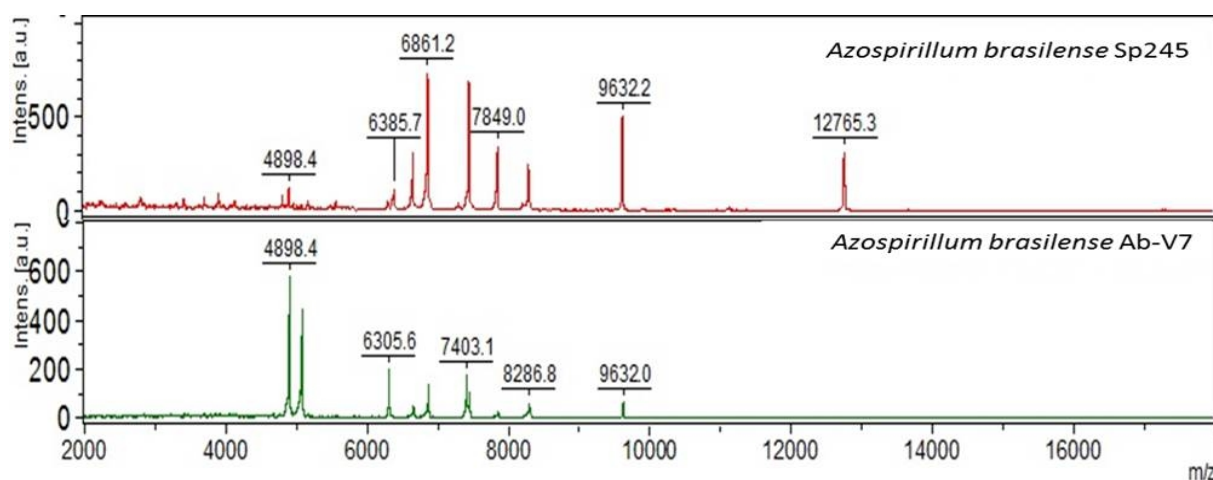


Figura 12. ESPECTROS DE MASSA ANALISADOS DE *Azospirillum brasilense* Sp245 E Ab-V7.

Tabela 9. COMPARAÇÃO DE PICOS OBTIDOS DE ESPECTROS DE ESTIRPES COMERCIALIZADAS COMO INOCULANTE.

<i>A. brasilense</i> Ab-V5				<i>A. brasilense</i> Ab-V6				<i>A. brasilense</i> Ab-V7			
Pico ($\bar{X}_{m/z}$) ¹	D.P. ²	N ³	% ⁴	Pico ($\bar{X}_{m/z}$) ¹	D.P. ²	N ³	% ⁴	Pico ($\bar{X}_{m/z}$) ¹	D.P. ²	N ³	% ⁴
6858,88	4,395	19	79,17	4897,57	0,815	14	58,33	6302,8	3,471	20	83,33
4898,00	1,462	17	70,83	9632,17	1,442	11	45,83	5079,6	1,404	20	83,33
6306,53	1,266	14	58,33	7445,16	1,167	10	41,67	4898,0	1,108	20	83,33
5080,06	1,532	14	58,33	6861,43	0,989	9	37,50	12766,5	3,003	11	45,83
7444,88	1,495	11	45,83	12778,10	2,010	7	29,17	5042,6	1,342	11	45,83
7403,63	1,440	10	41,67	7403,47	1,254	7	29,17	9633,5	1,405	10	41,67
9633,74	2,033	8	33,33	7434,99	1,319	6	25,00	7403,8	1,068	10	41,67
5042,99	2,373	8	33,33	6853,24	1,452	6	25,00	6862,1	0,963	10	41,67
12781	1,998	7	34,33	6304,94	1,149	6	25,00	8287,3	1,817	9	37,50
7863,62	1,583	7	35,33	5079,29	1,362	6	25,00	7444,9	0,740	9	37,50
6299,51	0,783	7	36,33	4808,80	1,220	6	25,00	6853,9	1,314	9	37,50
8287,76	1,311	6	37,33	6831,50	1,548	5	20,83	6652,1	1,461	9	37,50
7435,03	0,659	6	38,33	6709,73	0,523	5	20,83	7849,4	0,835	8	33,33
6710,83	1,191	6	39,33	9620,50	1,023	4	16,67	7435,1	1,086	8	33,33

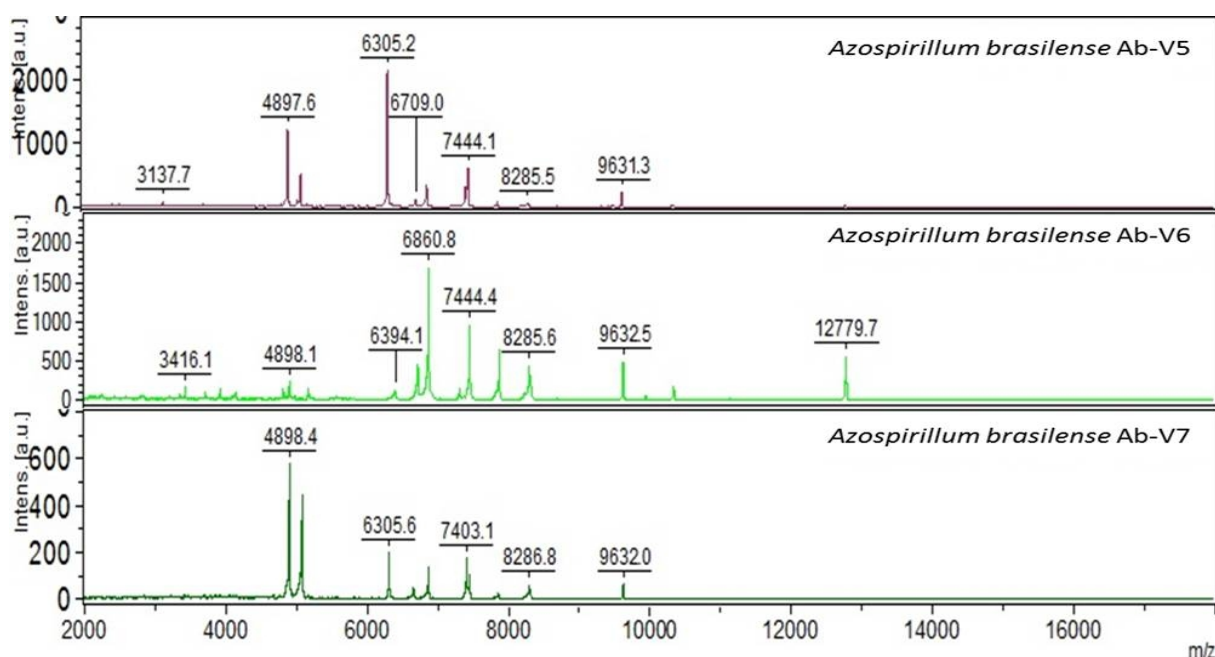


Figura 13. ESPECTROS DE MASSA ANALISADOS DE *Azospirillum brasilense* Ab-V5, Ab-V6 E Ab-V7.

5.2 ANÁLISE DE INOCULANTES COMERCIAIS CONTENDO ESTIRPES DE *Azospirillum brasilense*

5.2.1 CONTROLE DE QUALIDADE USANDO O MÉTODO PADRONIZADO DA RELARE

Foram analisados 6 inoculantes comerciais contendo as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *A. brasilense*, e um inoculante contendo *A. brasilense* Sp245, totalizando 7 inoculantes. A técnica seguiu o protocolo descrito na seção 4.2.1.1 de Material e Métodos. Os inoculantes passaram por diluição seriada e alíquotas das diluições foram plaqueadas em meios semi-seletivos. Depois de 5 dias, contaram-se as unidades formadoras de colônia (UFC) para o cálculo de células viáveis por mililitro. As contagens dos sete inoculantes são mostradas nas Tabelas 13, 14, 15, 16, 17, 18 e 19 do Apêndice.

Através da contagem de UFC nos diferentes meios, foi feita uma média de colônias crescidas por meio de cultura e por diluição analisada. Houve um mesmo padrão de crescimento entre os meios, com prevalência do meio DYGS nas diluições 10^{-5} e 10^{-6} , seguido do meio NA com valores próximos e NFb 3x (Figura 14). Na diluição 10^{-7} houve um maior crescimento de colônias no meio BDA. O meio NFb 3x obteve números baixos de crescimento em relação à DYGS e NA, uma vez que o meio NFb 3x possui uma composição mais controlada e os meios DYGS e NA são meios ricos, o que pode favorecer um crescimento maior e mais rápido das bactérias. O meio NFb 3x é também um meio semi-seletivo que favorece o crescimento de *Azospirillum*, enquanto os meios DYGS e NA permitem um crescimento rápido de possíveis contaminantes. Entretanto, mesmo tendo sido observado maior crescimento nos meios DYGS e NA, não foi verificado crescimento de contaminantes para nenhum dos inoculantes testados.

Ao analisar gráficos individuais das diluições (Figuras 15, 16 e 17), foi verificado padrão entre as diluições 10^{-5} e 10^{-6} nos inoculante 1, 2 e 4, prevalecendo o crescimento no meio DYGS. O inoculante 3 (contendo a estirpe Sp245 de *A. brasilense*) manteve seu padrão entre as diluições 10^{-6} e 10^{-7} com um crescimento

destacado para o meio DYGS. O inoculante 5 manteve seus números baixos, contudo o NFb 3x foi o meio com maior crescimento, o qual não é observado em outros inoculantes.

O inoculante 6 não apresentou crescimento na diluição 10^{-7} , e nas diluições 10^{-5} e 10^{-6} houve um crescimento desigual entre os meios, contudo os valores de NFb 3x mantiveram-se próximos de DYGS. O inoculante 7 se sobressaiu pelo número de colônias em todos os gráficos por exibir grande crescimento em NA, DYGS e BDA e nenhuma colônia em NFb 3x. O crescimento em BDA foi constatado apenas no inoculante 7 em todas as diluições, sobressaindo-se em 10^{-7} ; e também no inoculante 1, apresentando o maior número de colônias nesta diluição.

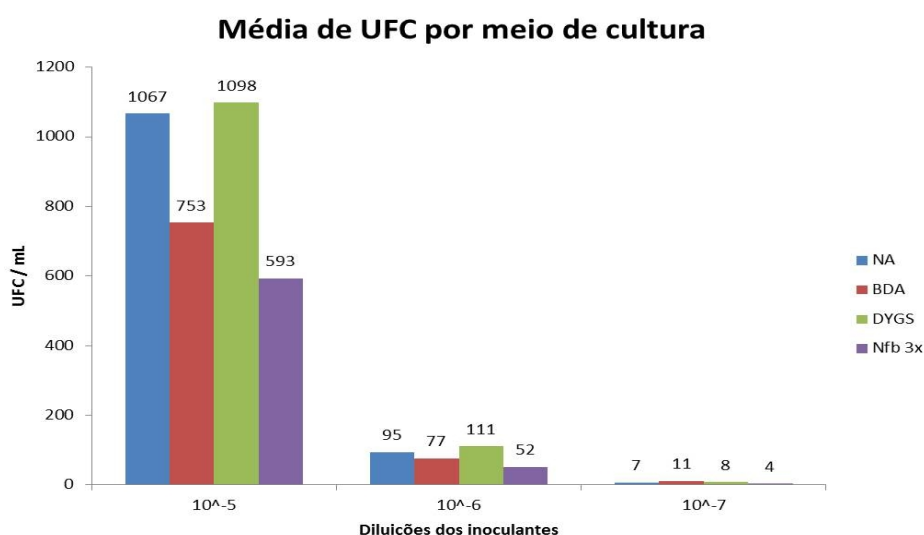


Figura 14. MÉDIA GERAL DE UFC/mL POR MEIOS DE CULTURA SEMI-SELETIVOS DE TRÊS DILUIÇÕES.

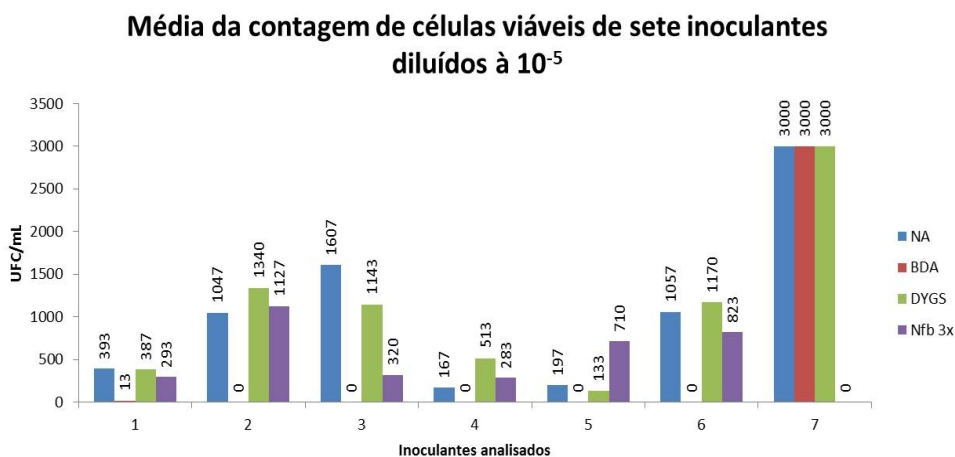


Figura 15. MÉDIA DE UFC/mL ADQUIRIDA ATRAVÉS DA CONTAGEM EM PLACAS DE CRESCIMENTO NOS MEIOS NA, BDA, DYGS E NFb 3x EM DILUIÇÃO 10^{-5} .

Os valores obtidos da contagem de células viáveis não está de acordo com o que foi recomendado no rótulo dos produtos. Segundo instruções da RELARE (2007), o produto ser eficiente dentro do prazo de validade, é necessário que o armazenamento esteja em condições adequadas por se tratar de um material biológico, sendo assim, um produto perecível.

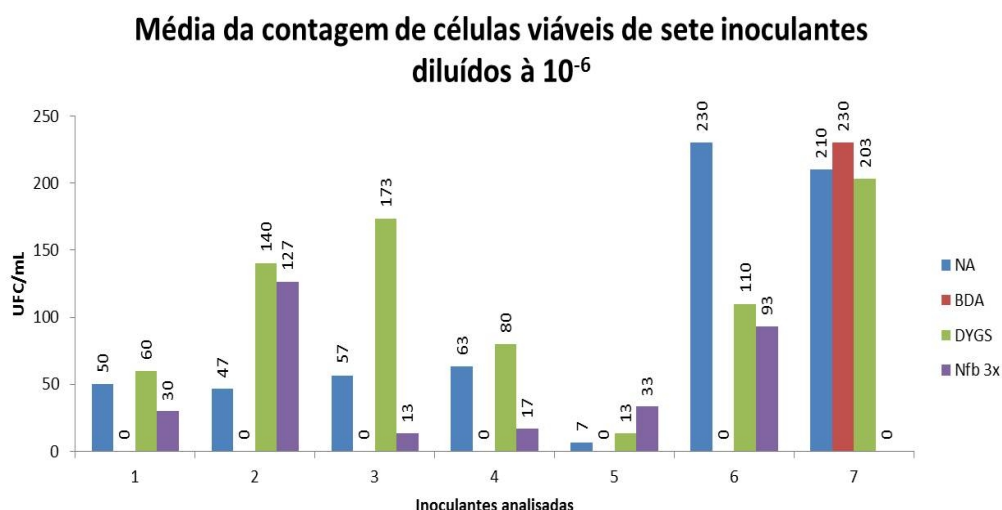


Figura 16. MÉDIA DE UFC/mL ADQUIRIDA ATRAVÉS DA CONTAGEM EM PLACAS DE CRESCIMENTO NOS MEIOS NA, BDA, DYGS E Nfb 3x EM DILUIÇÃO 10^{-6} .

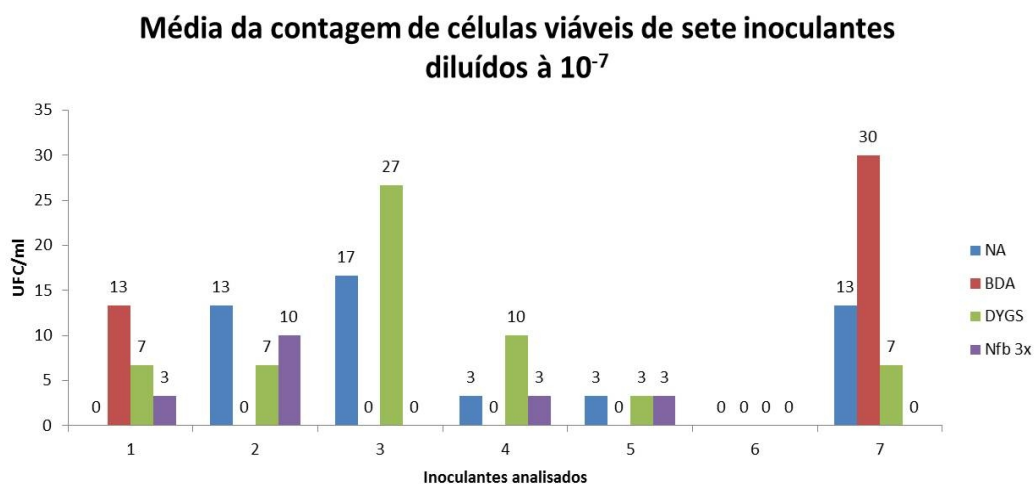


Figura 17. MÉDIA DE UFC/mL ADQUIRIDA ATRAVÉS DA CONTAGEM EM PLACAS DE CRESCIMENTO NOS MEIOS NA, BDA, DYGS e Nfb 3x EM DILUIÇÃO 10^{-7} .

Para contagem oficial das células viáveis, a RELARE considera que valores de UFC entre 30 a 200 por mL são aceitáveis, e valores maior ou menor o lote de inoculante é reprovado.

O protocolo recomenda o meio NA para o desenvolvimento de bactérias viáveis e cultiváveis, que favorece o crescimento de contaminantes já que os diazotrofos demoram mais tempo para se multiplicar. Mesmo não apresentando contaminantes, o crescimento neste meio foi destacado. O meio BDA favorece o crescimento de fungos e tem a propriedade de retardar a esporulação de alguns microrganismos, justificando o baixo crescimento, em geral, neste meio.

5.2.2 CONTAMINAÇÃO ARTIFICIAL DE INOCULANTE

A contaminação dos inoculantes foi simulada para avaliar a capacidade da metodologia padrão e a metodologia de identificação de bactérias por MALDI-TOF para uso no controle de qualidade dos produtos. Todos os inoculantes vieram originalmente puros de fábrica. A contaminação artificial foi realizada com a bactéria *Herbaspirillum seropedicae* RAM4 no inoculante 7, para mostrar a eficiência das técnicas. Esta bactéria foi escolhida por expressar uma proteína vermelha de fácil visualização a olho nu, permitindo sua identificação diretamente nas placas de cultivo.

Uma cultura líquida de *H. seropedicae* RAM4 em 5,0 mL de NFbHPN malato com antibiótico Km foi misturada a uma alíquota de 5,0 mL do inoculante, como descrito na seção 4.2.1.3. Esta mistura foi diluída e plaqueada nas condições padrões da RELARE. Após cinco dias de incubação, as placas passaram pela contagem das unidades formadoras de colônias.

A Figura 18 mostra que o crescimento na diluição 10^{-5} foi alto. Em 10^{-6} houve um maior crescimento em meio NA, seguido dos meios BDA e DYGS, e em 10^{-7} em meios BDA, DYGS e NA. Não foi constatado crescimento no meio NFb 3x. Nesses meios, o crescimento de RAM4 foi favorecido em meio NA e DYGS com muitas colônias vermelhas prevalecendo na superfície dos meios. Já o crescimento de RAM4 em meio BDA foi menor, favorecendo então o crescimento da bactéria do inoculante.

Foi realizada a contagem somente das colônias de RAM4 em cada meio. A média em meio NA foi a maior dentre o meios. Seguido e DYGS com crescimento

adequado. Em BDA houve baixo crescimento em 10^{-5} , e não houve crescimento em 10^{-6} e 10^{-7} . Em NFb 3x não houve crescimento em nenhuma das diluições. Este acontecimento pode ser justificado pelos meios NA e DYGS possuírem uma composição muito rica em nutrientes e o meio NFb 3x possuir uma composição limitada de carbono (Anexo 3). Por outro lado, o NFb é frequentemente utilizado para cultivo tanto de *Azospirillum* sp., quanto *Herbaspirillum* sp., com a utilização de lactato ou malato como fontes de carbono, respectivamente. Desta forma, era esperado o crescimento de colônias neste meio de cultura.

Pode-se analisar esses resultados através da Figura 20, onde as placas de cultura estão sob luz UV e as colônias de RAM4 emitem fluorescência. A identificação das colônias de *H. seropedicae* RAM4 nas placas de cultivo, através da proteína repórter vermelha, foi um pouco dificultada devido a uma leve semelhança apresentada com as colônias da bactérias *A. brasilense* Ab-V5, presente no inoculante. Desta forma, a diferenciação foi facilitada sob luz UV a 270 nm, uma vez que as proteína repórter vermelha da estirpe RAM 4 emite fluorescência.

Nestas condições de contaminação, o lote de inoculante seria reprovado, pois o crescimento de contaminante a partir da diluição 10^{-5} não é tolerado (RELARE, 2007).

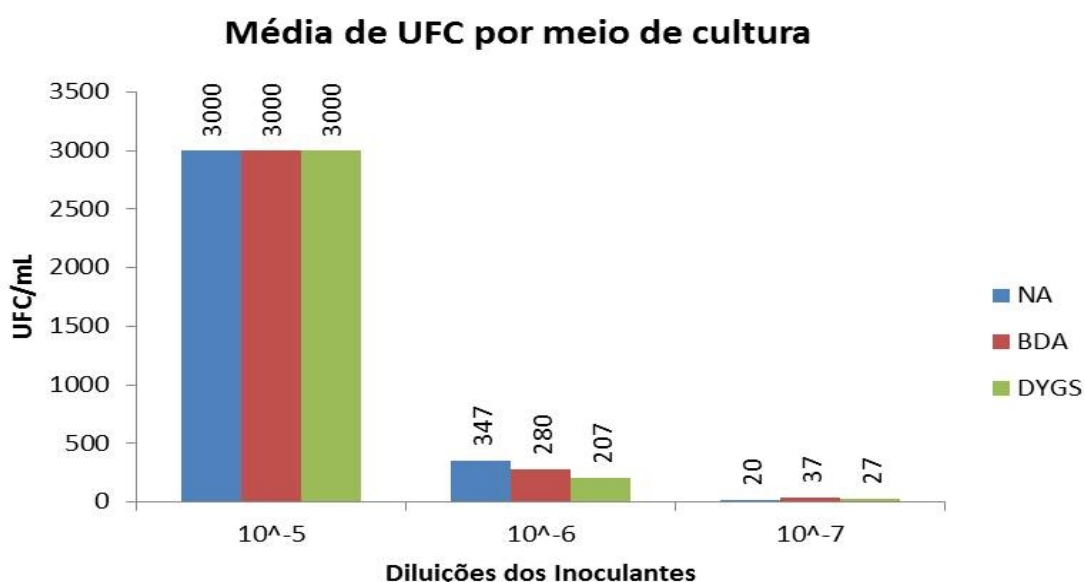


Figura 18. MÉDIA DE CRESCIMENTO DE UFC EM MEIOS SEMI-SELETIVOS COM CONTAMINAÇÃO ARTIFICIAL DE *Herbaspirillum seropedicae* RAM4.

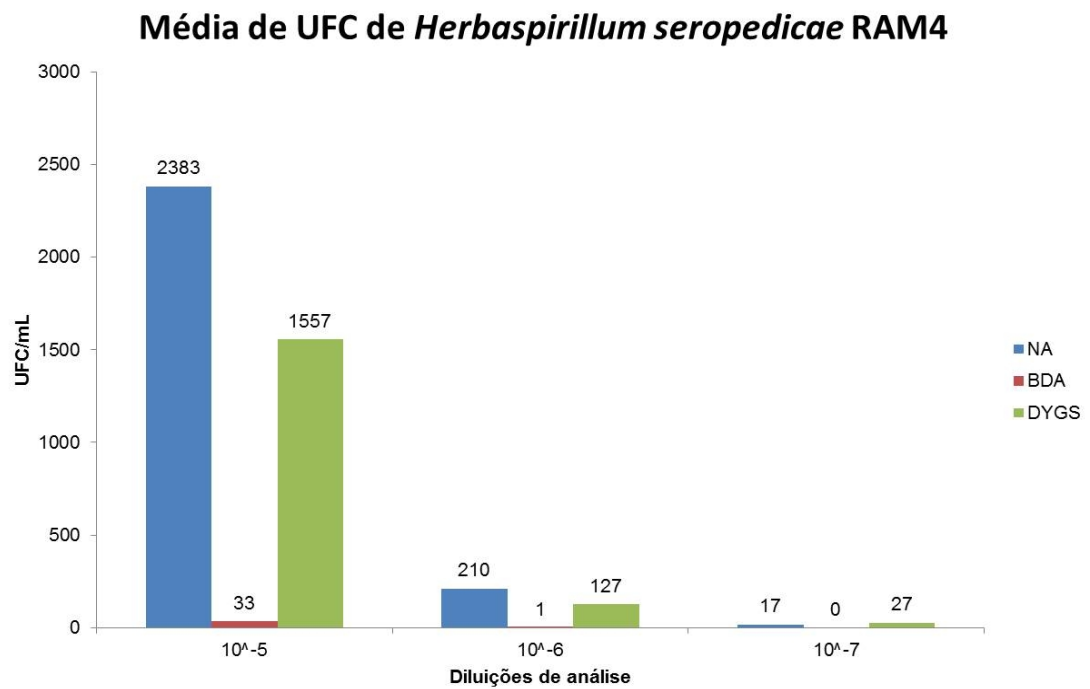


Figura 19. CONTAGEM DE UFC/mL DE COLÔNIAS DE *Herbaspirillum seropedicae* RAM4.

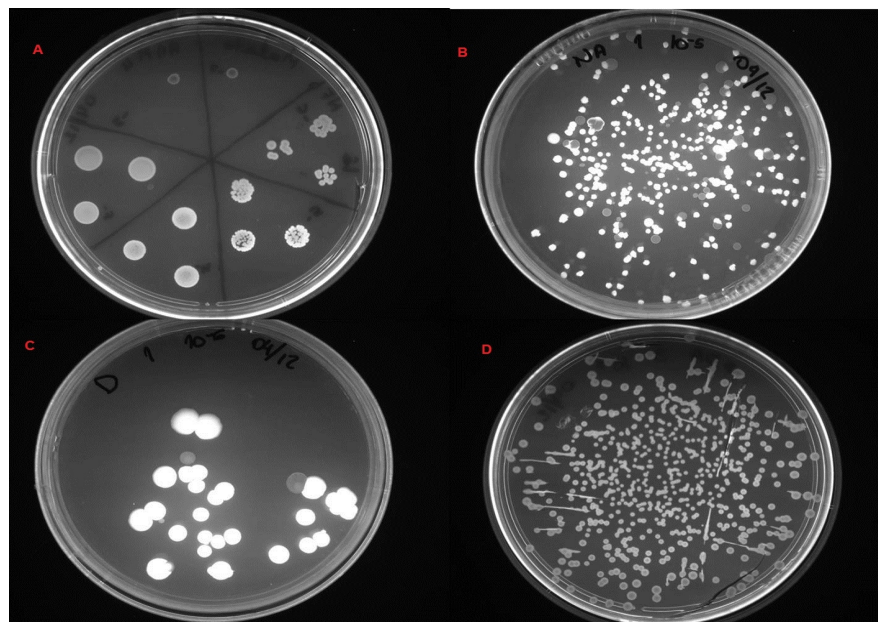


Figura 20. COLÔNIAS DE *Herbaspirillum seropedicae* RAM4 SOB FLUORESCÊNCIA DE LUZ UV A 270 nm.

(A) placa de meio NFb lactato apenas com RAM4; (B) placa de meio na com inoculante + RAM4; (C) placa de meio DYGS com inoculante + RAM4; (D) Placa de meio bda com inoculante + RAM4.

5.2.3 ESPECTROMETRIA DE MASSA NA IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS DE INOCULANTES COMERCIAIS

As colônias isoladas a partir da análise de pureza utilizando a metodologia padrão recomendada pela RELARE foram submetidas a espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF. Foram selecionadas 10 colônias de cada meio de cultura de maneira aleatória quando não apresentavam potenciais contaminações. Cada inoculante analisado gerou uma lista de picos que pode ser observada na Tabela 10, que puderam ser comparados com os picos das estirpes de referência. Para facilitar a análise, foi utilizado o programa MS-Analyser citado na Seção 4.3.2.

Tabela 10. LISTA DE PICOS DOS INOCULANTES 1 A 7 ANALISADOS POR MALDI-TOF MS.

INOCULANTE 1 ¹				INOCULANTE 2 ¹			
Pico ($\bar{X}_{m/z}$) ¹	D.P. ²	N ³	% ⁴	Pico ($\bar{X}_{m/z}$) ¹	D.P. ²	N ³	% ⁴
4899,25	1,306	23	95,83	4897,93	0,519	6	100,00
5080,72	1,301	22	91,67	4973,86	0,774	6	100,00
7398,48	1,741	20	83,33	5040,18	0,680	6	100,00
6857,99	1,280	19	79,17	5079,43	0,449	6	100,00
6302,34	1,500	18	75,00	6300,36	0,727	6	100,00
7440,99	1,436	18	75,00	6856,14	0,548	6	100,00
9630,69	1,411	15	62,50	7395,93	0,621	6	100,00
4860,54	1,781	10	41,67	7438,28	0,703	6	100,00
6648,63	1,824	10	41,67	7842,82	0,658	6	100,00
5039,17	0,869	7	29,17	8279,62	1,695	6	100,00
6110,21	1,460	7	29,17	9626,99	0,789	6	100,00
7843,7	0,423	7	29,17	4860,92	0,916	5	83,33
4976,18	1,455	5	20,83	6646,92	0,302	5	83,33
INOCULANTE 3 ¹				INOCULANTE 4 ¹			
4898,54	1,172	30	100	7470,8	1,527	12	92,31
5080	1,173	30	100	4893,29	1,418	11	84,62
6301,9	0,9737	30	100	5078,17	1,332	11	84,62
9626,94	1,545	27	90,00	6319,99	1,571	11	84,62
7438,65	1,271	25	83,33	7429,61	1,681	11	84,62
6170,91	1,073	24	80,00	6670,38	1,520	10	76,92
6856,66	1,288	23	76,67	5039,08	1,610	9	69,23
7396,68	1,185	20	66,67	6882,12	1,543	9	69,23
4274,8	1,045	18	60,00	6842,27	1,504	7	53,85

5040,07	2,012	16	53,33	7878,58	1,972	6	46,15
6833,29	1,814	16	53,33	6258,18	0,948	5	38,46
4811,87	1,569	14	46,67	8319,65	1,494	5	38,46
INOCULANTE 5¹				INOCULANTE 6¹			
4865,67	1,528	14	100,00	4885,92	1,84464	7	87,50
4693,78	1,322	10	71,43	5072,21	1,10359	7	87,50
4420,54	0,917	9	64,29	6313,1	1,23442	7	87,50
4103,9	0,962	8	57,14	4438,03	1,11637	6	75,00
5032,71	1,407	7	50,00	7463,55	1,11405	6	75,00
5071,86	1,524	7	50,00	4193,18	0,796	5	62,50
4176,42	1,052	6	42,86	6872,99	0,979	5	62,50
4887,42	1,286	6	42,86	7421,74	1,339	5	62,50
6662,12	1,508	6	42,86	4120,2	0,866	4	50,00
6874,61	1,738	6	42,86	4323,9	1,060	3	37,50
7421,09	2,196	6	42,86	4711,2	0,722	3	37,50
4932,79	1,223	5	35,71	5028,06	1,060	3	37,50
4796,81	1,419	3	21,43	6182,37	0,434	3	37,50
INOCULANTE 7¹							
9954,87	2,447	9	56,25				
7171,09	3,052	9	56,25				
7462,44	2,122	7	43,75				
7313,85	2,936	7	43,75				
6717,98	2,809	7	43,75				
5193,67	2,242	7	43,75				
4321,09	2,125	7	43,75				
6374,6	2,770	6	37,50				
5153,97	2,593	6	37,50				
7243,89	1,233	5	31,25				
7249,49	0,698	4	25,00				
6240,3	1,361	4	25,00				
5473,77	1,325	4	25,00				

¹Pico identificado por seu valor de m/z médio ($\bar{X}_{m/z}$) entre os espectros onde foi observado; ²D.P., DESVIO PADRÃO; ³Nº de espectros em que cada pico foi observado; ⁴porcentagem em relação ao total de espectros: inoculantes 1 (n=24), 2 (n=6), 3 (n=30), 4 (n=13), 5 (n=14), 6 (n=8) e 7(n=16).

No inoculante 1 foram encontrados três picos marcadores presentes na estirpe referência Ab-V5 de *A. brasilense*: 4.899,25 m/z com reprodutibilidade de 95,83%, 5.080,72 m/z com 91,67%, e 6.857,99 m/z com 79,17%. O inoculante 2 apresentou quatro picos em comum, 5.079,43 m/z , 4.897,93 m/z , 6.300,36 m/z , e

6.856,14 m/z , todos com 100% de reprodutibilidade. O inoculante 3 foi comparado com a estirpe referência Sp245 de *A. brasilense* e obteve-se dois picos marcadores compatíveis: 4.898,54 m/z e 5.080 m/z , ambos com 100% de reprodutibilidade entre os isolados do inoculante. Nenhum pico das estirpes referência Ab-V5 e Ab-V6 foi encontrado nos espectros dos inoculantes 4, 5, 6 e 7.

As Figuras 22 e 22 foram geradas no MS-Analyser no modo “Reflex”, sendo possível observar a reprodução das imagens dos espectros de inoculantes confrontadas com espectros das estirpes de referência. Foi possível averiguar que os inoculantes 1, 2 e 3 apresentaram perfil de picos semelhantes e que os inoculantes 4, 5, 6 e 7 mostraram-se variantes às referências, confirmando os dados das tabelas analisadas. Isto pode ter ocorrido pelo fato das colônias dos inoculantes 1, 2 e 3 terem sido analisadas ainda frescas, ou seja, imediatamente após serem retiradas da estufa de crescimento, e os demais inoculantes foram analisados depois de dias retirados da estufa.

Um banco de dados foi criado apenas com espectros de estirpes referências e isolados clínicos e associados a plantas, num total de 1.652 espectros, sendo: 546 espectros para estirpes referência de *Azospirillum*, *Herbaspirillum* e rizóbios; 424 espectros para isolados de trigo; e 682 espectros para isolados clínicos de *Aeromonas* e *Escherichia coli* (Tabela 11). Os espectros dos isolados de inoculantes foram confrontados com os espectros das referências através do software *Speclust on line* (ALM *et al.*, 2006), disponível no portal <http://bioinfo.thep.lu.se/speclust.html>, e foi possível obter um *score* de comparação. Os valores dos *scores* encontram-se na legenda das Figuras 22 e 22.

Foram também comparados os picos entre os inoculantes, para constatar se havia picos em comum entre eles. O pico 4.898 m/z , 6.858 m/z e 6.301 m/z foram encontrados nos inoculantes 1, 2 e 3, o primeiro com 95%, 100% e 100%, o segundo com 79,17%, 100% e 76,67%, e o terceiro com 75%, 100% e 100% de reprodutibilidade entre os isolados. O pico 5.080 m/z foi encontrado nos inoculantes 1, 2, 3 e 4 com 91,67%, 100%, 100% e 84,62%. O pico 5.040 m/z está presente apenas no inoculante 3 (53,33%) e 4 (69,23 %). Os picos 5.071 m/z , 7.421 m/z e 6.873 m/z estão presentes nos inoculantes 5 (50%, 42,86% e 42,86%) e 6 (87,5%, 62,5% e 62,5%).

Tabela 11. COMPOSIÇÃO DO BANCO DE DADOS DE ESPECTROS DE MASSA GERADO.

Nº de espectros	Organismo	Referência	Descrição
14	<i>A. brasilense</i>	STETS (2013b)	<i>A. brasilense</i> FP2 crescido em diferentes meios de cultura (DYGS, LA, NFb lactato, NFb malato e Batata)
10	<i>A. brasilense</i>	STETS (2013b)	<i>A. brasilense</i> FP2 crescido em NFb lactato
109	<i>A. brasilense</i>	STETS (2013b)	Diferentes estirpe de <i>A. brasilense</i>
33	<i>Azospirillum</i>	STETS (2013b)	
33	<i>Azospirillum</i>	STETS (2013b)	Diferentes estirpe da série FP de <i>A. brasilense</i> crescido em meio de cultura DYGS
55	<i>Azospirillum</i>	STETS (2013b)	
20	<i>Azospirillum</i>	STETS (2013b)	Diferentes espécies de <i>Azospirillum</i> (<i>A. amazonense</i> , <i>A. brasilense</i> e <i>A. lipoferum</i>)
26	Desconhecido	STETS (2013b)	Diferentes idades das colônias analisadas (1 a 14 dias)
32	<i>Herbaspirillum</i>	STETS (2013b)	Diferentes espécies de <i>Herbaspirillum</i>
48	Rizóbios	STETS (2013b)	Diferentes rizóbios
80	Desconhecido	STETS (2013b)	Plantas de trigo controle de experimento de inoculação com <i>A. brasilense</i> FP2 a campo
121	Desconhecido	STETS (2013b)	Plantas de trigo inoculadas de experimento de inoculação com <i>A. brasilense</i> FP2 a campo
288	<i>Aeromonas</i>	DALLAGASSA (2012)	Diferentes isolados clínicos de <i>Aeromonas</i>
102	<i>E. coli</i>	DALLAGASSA (2012)	Diferentes isolados clínicos de <i>E. coli</i> diarréica
111	<i>E. coli</i>	DALLAGASSA (2012)	Diferentes isolados clínicos de <i>E. coli</i> de paciente com infecção urinária
181	<i>E. coli</i>	DALLAGASSA (2012)	Diferentes isolados de <i>E. coli</i> não diarréica
223	Desconhecido	FERRARI (2012)	Isolados de plantas de trigo de experimento de inoculação com <i>A. brasilense</i> Ab-V5 e diferentes doses de N
166	<i>Azospirillum</i>	Este trabalho	Diferentes espécies de <i>Azospirillum</i> e estirpes de <i>A. brasilense</i> referência

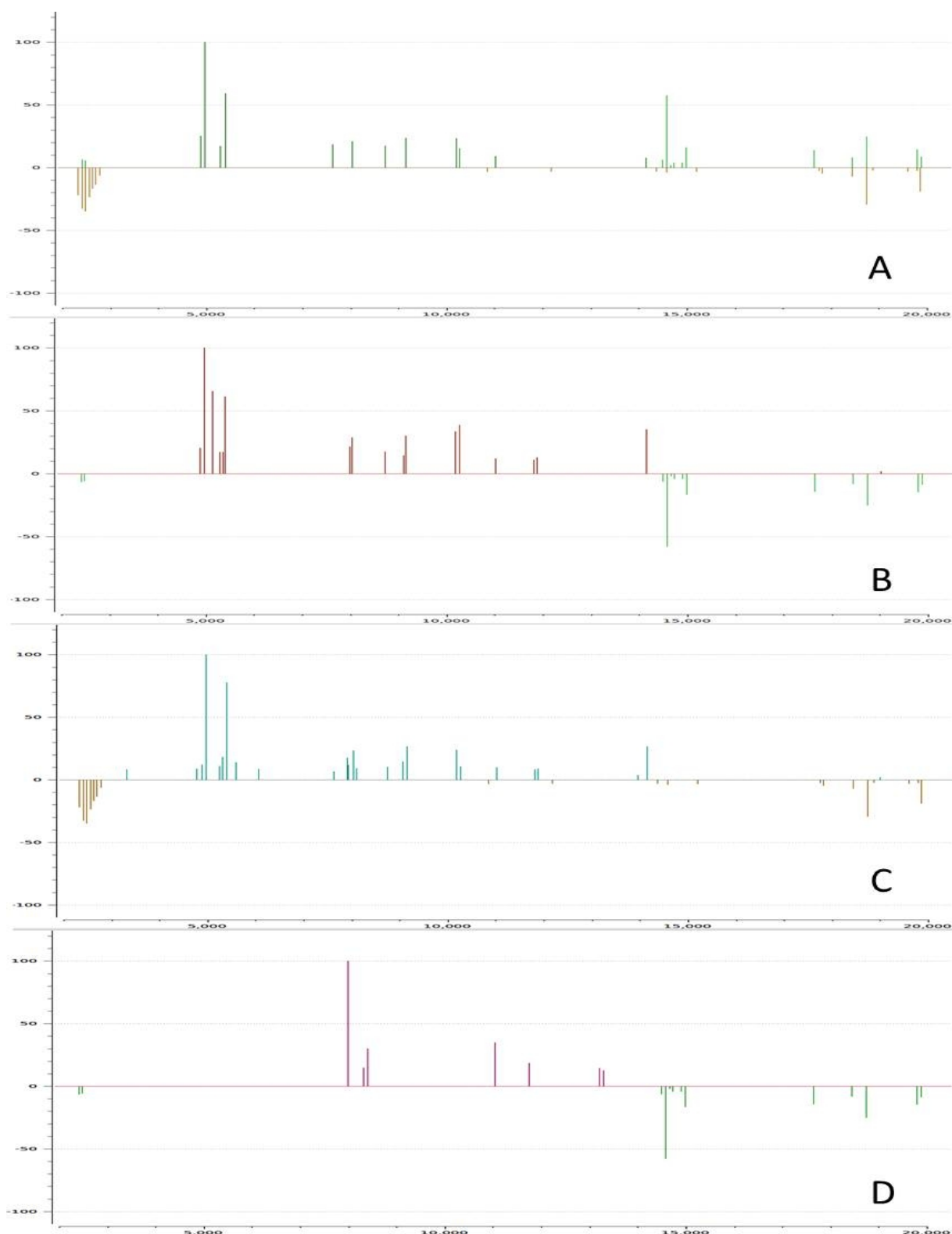


Figura 21. ESPECTROS REPRESENTATIVOS DE INOCULANTES CONTRA ESPECTROS DE REFERÊNCIA.

.Eixo X – m/z ; eixo Y – intensidade. (A) encima inoculante 1, embaixo Ab-V6; Score: 4.25 para *Azospirillum brasilense* FP0. (B) encima inoculante 2, embaixo Ab-V5; Score: 5.02 para *Azospirillum brasilense* Ab-V5 (C) encima inoculante 3, embaixo Sp245; Score: 8.67 para *Azospirillum brasilense* FP7 (D) encima inoculante 4, embaixo Ab-V5; Score: 3.29 para *Azospirillum brasilense* SF9.

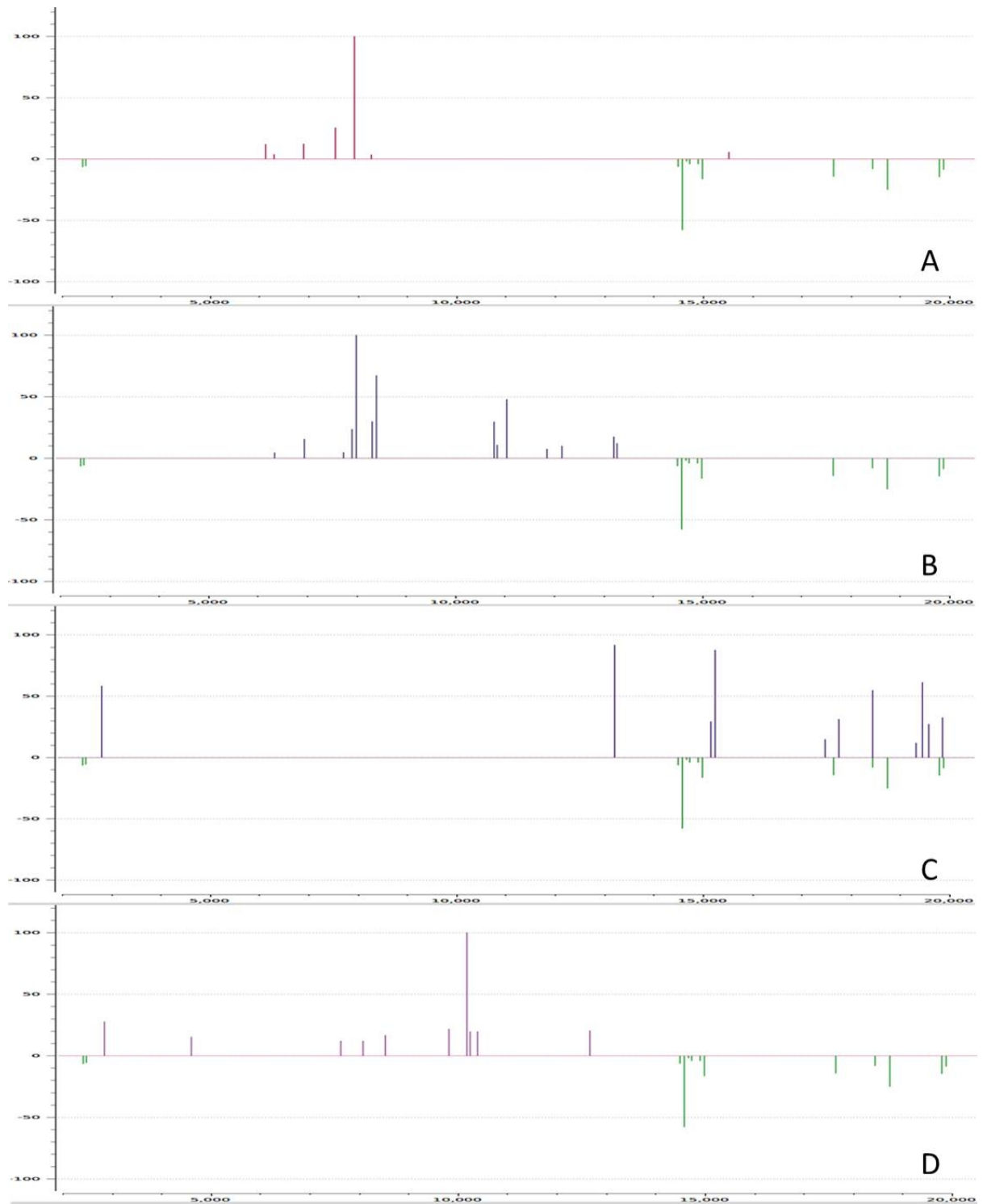


Figura 22. ESPECTROS REPRESENTATIVOS DE INOCULANTES CONTRA ESPECTROS DE REFERÊNCIA.

Eixo X – m/z ; eixo Y – intensidade. (A) encima inoculante 5, embaixo Ab-V5; Score: 1.86 para SEMIASMWassen. (B) encima inoculante 6, embaixo Ab-V5; Score: 3.53 para *Escherichia coli* Diarreica-edl933. (C) encima inoculante 7, embaixo Ab-V5; Score: 1.91 para Isolado de trigo C60Nr3-d. (D) encima *H. seropedicae* RAM4, embaixo Ab-V5; Score: 1.91 para Isolado de trigo C60Nr3-d.

Stets *et al.* (2013a) realizaram teste de reprodutibilidade de picos em meios de cultura BDA, DYGS, LA e NFbHPN lactato ou malato. Foi constatado que 77,3% de similaridade dos picos entre as replicatas de cada meio, contudo a similaridade caiu para 37,9% ao comparar os cinco meios.

5.3 REISOLAMENTO DE ESTIRPES DE *A. brasilense* DE RAIZ DE MILHO

5.3.1 REISOLAMENTO DE *A. brasilense* Ab-V5

Azospirillum brasilense Ab-V5 foi inoculado em raízes de sementes germinadas de milho para o procedimento descrito na seção 4.5.3. Depois do crescimento das plântulas por 3 e 7 dias (1ª e 2ª coleta) e do plaqueamento para recuperação das bactérias, foi verificado o crescimento de fungos nas placas de diluições menores e as colônias de bactérias apresentavam homogeneidade na morfologia. As seis colônias isoladas da primeira coleta tiveram confirmação da identidade para a estirpe Ab-V5 pela amplificação por PCR de fragmento estirpe-específico, usando o par de oligonucleotídeos iniciadores AzoR2.1 desenvolvido por Stets (2013b) (Figura 23). No controle negativo (sem inoculação de bactéria) não houve crescimento de fungos ou bactérias.

O procedimento para aquelas que cresceram em meio semi-sólido da 1ª e 2ª coleta foi realizado depois de serem isoladas em meio sólido com os antibióticos de resistência para *A. brasilense* Ab-V5. Apenas duas colônias cresceram e amplificaram o fragmento estirpe-específico (Figura 24) confirmando a identidade para *A. brasilense* Ab-V5.

Na 2ª coleta de bactérias da raiz de milho observou-se que as colônias de bactérias mostraram morfologia homogênea e houve menos crescimento de fungo. No total, foram isoladas seis colônias que foram utilizadas na espectrometria de massa e amplificação de fragmento estirpe-específico. Na Figura 25 está o resultado da eletroforese, que confirma a amplificação de três colônias. O controle negativo não apresentou crescimento de bactérias ou fungos.

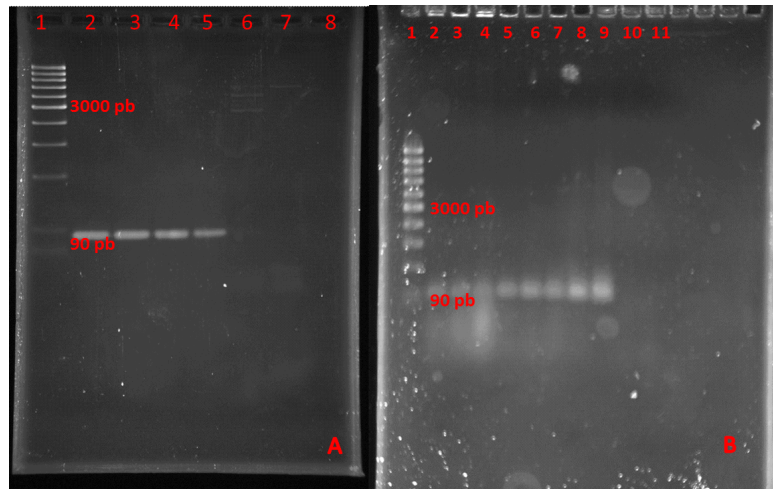


Figura 23. AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTO DE 90 PB ESTIRPE-ESPECÍFICO PARA *A. brasilense* FP2/Ab-V5 A PARTIR DE COLÔNIAS ISOLADAS DE RAIZ DE MILHO DA 1ª COLETA.

Ou após 3 dias de inoculação. Figura A: (1) MARCADOR MOLECULAR; (2) FP2 1/50; (3) FP2 1/500; (4) Ab-V5 1/50; (5) Ab-V5 1/500; (6) Ab-V6 1/50; (7) Ab-V6 1/500; (8) controle negativo. Figura B: (1) MARCADOR MOLECULAR; (2) isolado 1 sem antibiótico; (3) isolado 2 sem antibiótico; (4) isolado 3 sem antibiótico; (5) isolado 1 com antibiótico; (6) isolado 2 com antibiótico; (7) isolado 3 com antibiótico; (8) FP2 (controle positivo de amplificação); (9) Ab-V5 (controle positivo de amplificação); (10) Ab-V6 (controle negativo de amplificação); (11) controle negativo (sem DNA).

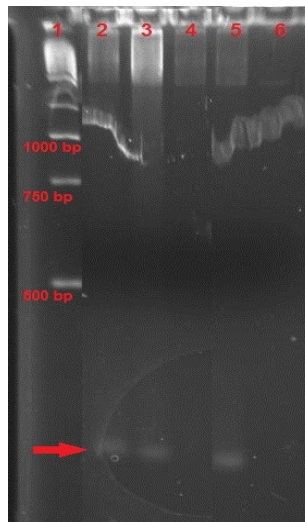


Figura 24. AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTO DE 90 PB ESTIRPE-ESPECÍFICO PARA *A. brasilense* FP2/Ab-V5 A PARTIR DE COLÔNIAS ISOLADAS DE RAIZ DE MILHO INOCULADO COM Ab-V5.

Isolados em meio semi-sólido da 1ª coleta (após 3 dias de inoculação). (1) MARCADOR MOLECULAR, (2) isolado 1.10^{-5} , (3) isolado 1.10^{-3} , (4) vazio, (5) Ab-V5 (controle positivo de amplificação), (6) controle negativo de amplificação (sem DNA).

5.3.2 REISOLAMENTO DE *A. brasilense* Ab-V5 e Ab-V6 PRESENTES EM INOCULANTE COMERCIAL

Foi utilizado o inoculante 7 para o experimento de inoculação em milho. O inoculante foi misturado às sementes como recomendado na embalagem do produto. As sementes foram plantadas e então submetidas à crescimento na casa de vegetação. As plântulas de 3 dias (1ª coleta) e 7 dias (2ª coleta) foram separadas para o re-isolamento das bactérias inoculadas em meio sólido e meio semi-sólido. O re-isolamento de *A. brasilense* Ab-V5 e Ab-V6 do inoculante comercial em placas com e sem antibiótico promoveu o crescimento de colônias uniformes morfologicamente. Não houve crescimento de fungos ou bactérias no controle negativo.

Foram isoladas seis colônias da 1ª coleta, seis colônias da 2ª coleta e seis colônias do meio semi-sólido. Destas, nenhuma amplificou o fragmento estirpe-específico, sendo assim, os isolados analisados não são *Azospirillum brasilense* Ab-V5. Como alternativa para identificação, o gene 16S rDNA foi amplificado por PCR com os oligonucleotídeos iniciadores Y1/Y3 e submetido ao sequenciamento, mas não houve resultados satisfatório que permitisse a identificação da estirpe.

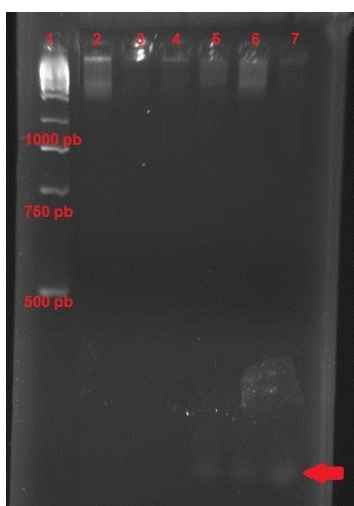


Figura 25. AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTO DE 90 PB ESTIRPE-ESPECÍFICO PARA *A. brasilense* FP2/Ab-V5 A PARTIR DE COLÔNIAS ISOLADAS DE RAIZ DE MILHO INOCULADO COM Ab-V5 DA 2ª COLETA. Ou após 7 dias de inoculação. (1) MARCADOR MOLECULAR; (2) isolado 1 com antibiótico; (3) isolado 2 com antibiótico; (4) isolado 3 com antibiótico; (5) isolado 1 sem antibiótico; (6) isolado 2 sem antibiótico; (7) isolado 3 sem antibiótico.

5.3.3 ANÁLISE DE ESPECTROMETRIA DE MASSA DE ISOLADOS DE RAIZ DE MILHO

Todos os isolados de raízes de milho inoculado com *A. brasilense* Ab-V5 referência e com inoculante comercial da 1ª e 2ª coletas foram submetidos à análise de MALDI-TOF, e geraram a lista de picos representada na Tabela 12. Foi possível identificar três picos comuns entre os isolados de milho inoculado com Ab-V5 e com inoculante comercial: 6.357 m/z com 85,71% e 75%; 7.489 m/z com 85,71% e 75%; e 7.449 m/z com 57,14% e 75% de reprodutibilidade, respectivamente. Entretanto, ao compará-los com as estirpes referências, não foi verificado tais picos. Os picos também foram comparados com picos dos inoculantes analisados anteriormente, mas não houve semelhança entre os dados.

Tabela 12. LISTA DE PICOS DE COLÔNIAS RE-ISOLADAS DE RAIZ DE MILHO INOCULADA COM *A. brasilense* AB-V5 E INOCULANTE COMERCIAL.

Isolados de milho – Ab-V5 ¹				Isolados de milho – inoculante ¹			
Pico ($\bar{X}_{m/z}$) ¹	D.P. ²	N ³	% ⁴	Pico ($\bar{X}_{m/z}$) ¹	D.P. ²	N ³	% ⁴
4956,8	0,976509	12	85,71	4965,27	1,085	11	91,67
6227,77	1,81098	12	85,71	4929,66	1,723	9	75,00
6357,81	1,62605	12	85,71	5145,67	0,737	9	75,00
7489,32	1,93351	12	85,71	6359,01	0,827	9	75,00
6290,68	2,36864	9	64,29	6701,47	0,948	9	75,00
7449,75	1,93668	8	57,14	6871,35	1,1047	9	75,00
6911,16	1,39146	7	50,00	6909,76	0,983	9	75,00
6112,65	0,561994	6	42,86	7447,23	0,917	9	75,00
3138,5	1,58014	5	35,71	7487,76	0,865	9	75,00
9661,84	2,02327	5	35,71	8322,38	1,377	9	75,00
2611,01	0,187837	3	21,43	9659,24	1,256	9	75,00
5138,78	1,27417	3	21,43	5108,22	0,752	7	58,33
6262,8	1,14009	3	21,43	7346,45	1,181	7	58,33
6329,92	0,170898	2	14,29	7888,44	0,954	7	58,33

¹Pico identificado por seu valor de m/z médio ($\bar{X}_{m/z}$) entre os espectros onde foi observado;

²D.P., DESVIO PADRÃO; ³Nº de espectros em que cada pico foi observado; ⁴porcentagem em relação ao total de espectros para os isolados de Ab-V5 (n=14) e isolados de inoculante (n=12).

Nas Figuras 26 e 27 estão representados os espectros de isolados de raiz de milho com inoculação de *A. brasilense* Ab-V5 e inoculante comercial. Os isolados também passaram pelo banco de dados fornecendo os score de comparação (informações contidas nas legendas).

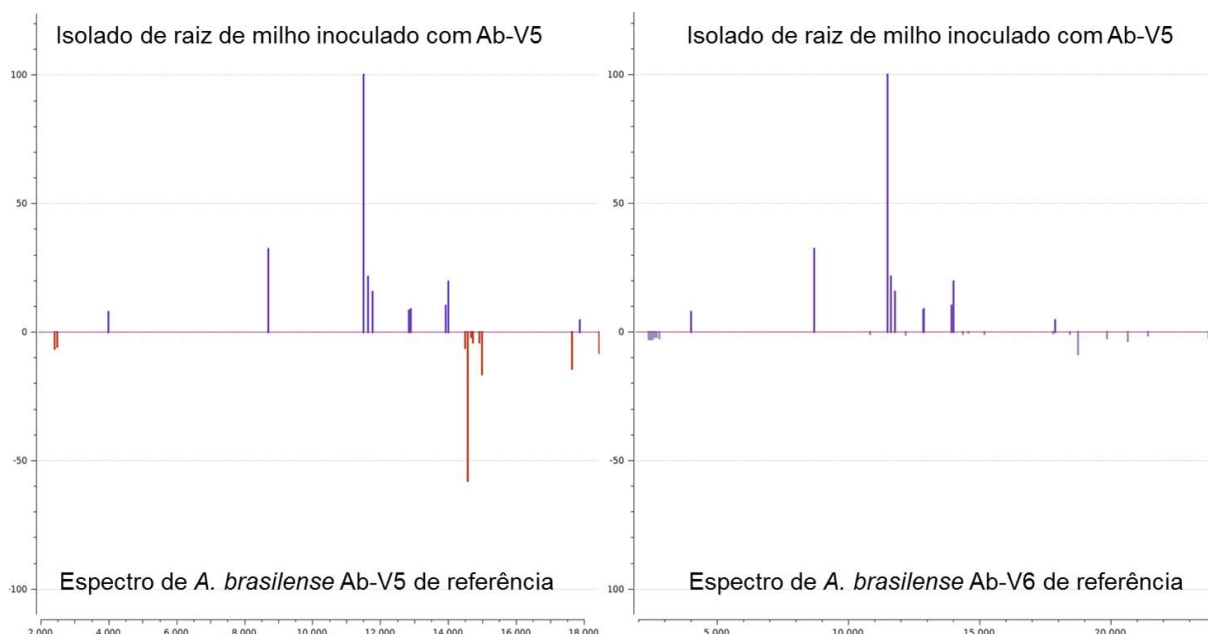


Figura 26. ESPECTROS DE MASSA DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE RAIZ DE MILHO INOCULADAS COM *Azospirillum brasilense* Ab-V5.

Eixo X – m/z ; eixo Y – intensidade. Figura da esquerda – isolado encima confrontado com estirpe referência Ab-V5. Figura da direita – isolado encima confrontado com estirpe referência Ab-V6. Score: 0.96 para *Azospirillum brasilense* Ab-V5.

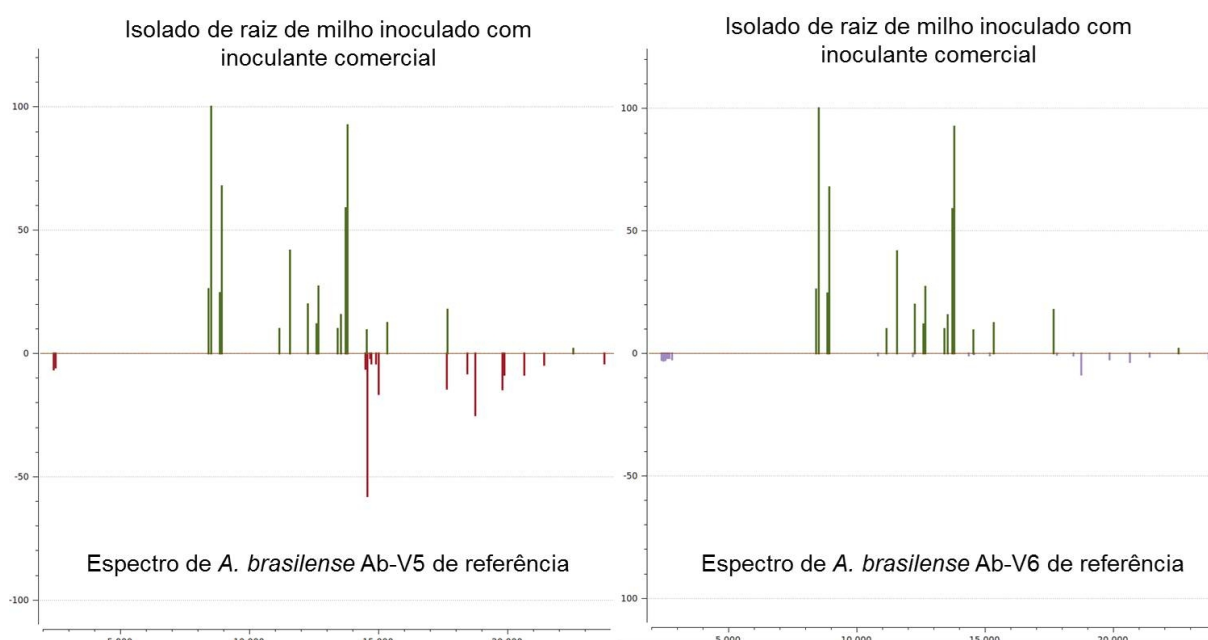


Figura 27. ESPECTROS DE MASSA DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE RAIZ DE MILHO INOCULADAS COM INOCULANTE COMERCIAL.

Eixo X – m/z ; eixo Y – intensidade. Figura da esquerda – isolado de inoculante comercial encima confrontado com estirpe referência Ab-V5. Figura da direita – isolado encima de inoculante comercial confrontado com estirpe referência Ab-V6. Score: 2.71 para *Azospirillum brasilense* FP9.

6. CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que:

- Foram determinados padrões de espectros de MALDI-TOF MS para estirpes referências FP2, Sp245 e seus derivados de *Azospirillum brasilense*, sendo possível a identificação e diferenciação dessas estirpes e entre as espécies *A. brasilense* e *A. lipoferum* DSM 1691 e *Escherichia coli* BL21;
- Foi obtida a padronização do método de análise em espectrometria de massa MALDI-TOF para controle de qualidade de inoculantes. Foi verificado que os isolados de inoculantes podem não ser *Azospirillum brasilense* Ab-V5 ou Ab-V6 por não apresentarem o perfil de picos correspondente da estirpe referência e por não amplificarem o fragmento estirpe-específico;
- Através da técnica de identificação por espectrometria de massa foi possível detectar a presença do contaminante artificial devido ao aparecimento de espectro de massas diferente das estirpes referências;
- *Azospirillum brasilense* AbV5 foi recuperado de raiz de milho, sendo ele identificado através de amplificação de fragmento estirpe-específico, contudo o perfil de picos apresentado nos espectros de massa não condiz com os espectros das estirpes referências. Já a recuperação de bactérias de inoculante em raiz de milho não obteve sucesso pois nenhum isolado foi identificado como Ab-V5 ou Ab-V6 de *Azospirillum brasilense* através da amplificação estirpe-específico ou por espectrometria de massa, apesar de apresentarem resistência aos antibióticos.

REFERÊNCIAS

- AEBERSOLD, R.; GOODLETT, D.R. Mass Spectrometry in Proteomics. **Chem. Rev.**, vol. 101, p. 269-295, 2001.
- AHEMAD, M.; KIBRET, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. **Journal of King Saud University – Science**, v. 26, p. 1–20, 2014.
- ALM, R.; JOHANSSON, P.; HJERNØ, K.; EMANUELSSON, C.; RINGNÉR, M.; HÄKKINEN, J. Detection and identification of protein isoforms using cluster analysis of MALDI-MS mass spectra. **J. Proteome Res.**, vol. 5, p. 785-792, 2006.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, vol. 25, p. 3389-3402, 1997.
- ANDRÉS-BARRAO, C.; BENAGLI, C.; CHAPPUIS, M.; PÉREZ, R. O.; TONOLLA, M.; BARJA, F. Rapid identification of acetic acid bacteria using MALDI-TOF mass spectrometry fingerprinting. **Systematic and Applied Microbiology**, vol. 36, p. 75–81, 2013.
- ANHALT, J.P.; FENSELAU, C. Identification of bacteria using mass spectrometry. **Anal Chem**, vol. 47, p. 219–225, 1975.
- Associação Nacional dos Produtores e Importadores de Inoculantes – ANPII. Disponível em: <<http://www.anpii.org.br/>>. Acesso em: 22/12/2013.
- BAKHTIAR, R.; NELSON, R.W. Mass Spectrometry of the Proteome. **Mol Pharmacol**, vol. 60, no. 3, p. 405-415, 2001.
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 77, p.549-79, 2005.
- BARRAQUIO, W. L.; REVILLA, L.; LADHA, J. K. Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from wetland rice. **Plant and Soil**, v.194, p.15-24, 1997.
- BASHAN, Y.; LEVANONY, H.; WHITMOYER, R. E. Root surface colonization of non-cereal crop plants by pleomorphic *Azospirillum brasilense*. **Journal of General Microbiology** v. 137, p. 187–196, 1991.
- BASHAN, Y. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. **Biotechnology Advances**, vol. 16, no. 4, p. 729-770, 1998.
- BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E. Protection of tomato seedlings against infection by *Pseudomonas syringae* pv. tomato by using the plant growth-promoting bacterium

Azospirillum brasilense. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 2637–2643, 2002.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; DE-BASHAN, L.E. *Azospirillum*-plant relationships physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). **Can. J Microbiol.**, v. 50, p. 521-577, 2004.

BEN DEKHIL, S.; CAHILL, M.; STACKEBRANT, E.; SLY, L. I. Transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *largomobilis* to the genus *Azospirillum* as *Azospirillum largomobile* comb. Nov., and elevation of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *paroensis* to the new type species of *Conglomeromonas*. **Syst. Appl. Microbiol.**, v.20, p.72-77, 1997.

BERINGER, J.E. R Factor in *Rhizobium leguminosarum*. **Journal of General Microbiology**, vol. 84, p. 188-198, 1974.

BISWAS, S.; ROLAIN, J. M. Use of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of bacteria that are difficult to culture. **Journal of Microbiological Methods**, v. 92, 14–24, 2013.

CANTÚ, M. D.; CARRILHO, E.; WULFF, N. A.; PALMA, M. S. **Química Nova** [online], v. 31, n. 3, p. 669-675, 2008.

CARBONNELLE, E.; BERETTI, J.L.; COTTYN, S.; QUESNE, G.; BERCHE, P.; NASSIF, X.; FERRONI, A. Rapid identification of Staphylococci isolated in clinical microbiology laboratories by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **J Clin Microbiol**, vol. 45, p. 2156–2161, 2007.

CARBONNELLE, E.; MESQUITA, C.; BILLE, E. *et al.* MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. **Clin Biochem**, vol. 44, p. 104–109, 2011.

CAVALLET, L. H.; PESSOA, A. C. S.; HELMICH, J. J.; HELMICH, P. R.; OST, C. F. Produtividade do milho em resposta à aplicação de nitrogênio e inoculação das sementes com *Azospirillum* spp. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.4, n.1, p.129-132, 2000.

CLAYDON, M. A.; DAVEY, S. N.; EDWARDS-JONES, V.; GORDON, D. B. The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. **Nat. Biotechnol.**, vol. 14, p. 1584–1586, 1996.

COMPANT, S.; CLÉMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 42, p. 669-678, 2010.

CREUS, C. M.; GRAZIANO, M.; CASANOVAS, E. M.; PEREYRA, M. A.; SIMONTACCHI, M.; PUNTARULO, S.; BARASSI, C. A.; LAMATTINA, L. Nitric oxide is involved in the *Azospirillum brasilense*-induced lateral root formation in tomato. **Planta**, v. 221, p. 297–303, 2005.

CROXATTO, A.; PROD'HOM, G.; GREUB, G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. **FEMS Microbiol Rev**, vol. 36, p. 380–407, 2012. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x.

CRUZ, L.M.; SOUZA, E.M.; WEBER, O.B.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F.O. 16S Ribosomal DNA Characterization of Nitrogen-Fixing Bacteria Isolated from Banana (*Musa* spp.) and Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill). **Applied and Environmental Microbiology**, Vol. 67, No. 5, p. 2375–2379, 2001.

DALLAGASSA, Cibelle de Borba. **Caracterização de estirpes de Aeromonas Spp. E Escherichia Coli através de Espectrometria de Massa Maldi-tof**. 69 p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

DEMIREV, P.A.; HO, Y.P.; RYZHOV, V.; FENSELAU, C. Microorganism identification by mass spectrometry and protein database searches. **Anal Chem**, vol. 71, p. 2732–2738, 1999.

DEMIREV, P. A.; FENSELAU, C. Mass spectrometry for rapid characterization of microorganisms. **Annu. Rev. Anal. Chem**, vol. 1, p. 71–93, 2008.

DINGLE, T. C.; BUTLER-WU, S. MALDI-TOF Mass Spectrometry for Microorganism Identification. **Clin Lab Med**, v. 33, p. 589–609, 2013.

DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of nitrogen fixation. **Nature Rev. Micro.**, vol. 2, p. 621-631, 2004.

DÖBEREINER, J.; DAY, J. M. Associative symbioses in tropical grasses characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. In: NEWTON, W. E.; NYMAN, C. J. (Eds). Proc. of the 1st. Intl. Symp. **Nitrogen Fixation**. Pullman: Washington Univ. Press, v.2, p.518-38, 1976.

DÖBEREINER, J. The genera *Azospirillum* and *Herbaspirillum*. In BALLOWS, A., TRUPPER, H.G., DWORKING, M., HARDER, W. (Ed.). **The Prokaryotes**. v.3., p.2236-3353, 1991.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, I. J. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas: Brasília: Embrapa-SPI: Otaguai, RJ: Embrapa-CNPAB, p. 60, 1995.

ECKERT, B.; WEBER, O. B.; KIRCHHOF, G.; HALBRITTER, A.; STOFFELS, M.; HARTMANN, A. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 51, n. 1, p.17-26, 2001.

EMBRAPA – Disponível em: 25 de setembro de 2012 - <http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2010/agosto/4asemana/resultados-de-pesquisas-sobre-fixacao-biologica-de-nitrogenio-revelam-resultados-promissores/>

EMBRAPA – Disponível em: 25 de setembro de 2010 -

<<http://plataformarg.cenargen.embrapa.br/rede-microbiana/noticias/inoculante-reduz-a-aplicacao-de-fertilizante-na-cultura-do-milho>>

EMBRAPA – Disponível em: 25 de setembro de 2010 - <<http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2007/abril/foldernoticia.2007-04-23.6159564463/noticia.2007-04-25.1804397113/>>

EMBRAPA – Disponível em: 25 de setembro de 2010 - <<http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2008/setembro/4a-semana/produto-inedito-reduz-o-uso-de-fertilizantes-na-producao-de-cana-de-acucar/?searchterm=inoculante%20cana-de-a%C3%A7%C3%BAcar>>

ENGELHARD, M.; HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B. Preferential occurrence of diazotrophic endophytes, *Azoarcus* spp., in wild rice species and land races of *Oryza sativa* in comparison with modern races, **Environ. Microbiol.**, v. 2, p. 131-141, 2000.

FERRARI, Gracieli. **Análise microbiológica e molecular de bactérias associadas a plantas de trigo controle e submetidas a inoculação com bactérias diazotróficas**. Livro de resumos – 20º EVINCI. 2012.

FERREIRA, L.; SÁNCHEZ-JUANES, F.; GARCÍA-FRAILE, P.; RIVAS, R.; MATEOS, P.F.; *et al.* MALDI-TOF Mass Spectrometry is a fast and reliable platform for identification and ecological studies of species from family Rhizobiaceae. **PLoS ONE**, vol. 6, no. 5, p. e20223, 2011. DOI:10.1371/journal.pone.0020223.

GIEBEL, R.A; FREDENBERG, W.; SANDRIN, T.R. Characterization of environmental isolates of *Enterococcus* spp. by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Water Research**, vol. 42, p. 931–940, 2008.

GHOLAMI, A.; SHAHSAVANI, S.; NEZARAT, S. The effect of plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR) on germination, seedling growth and yield of maize. **World Academy of Science, Engineering and Technology**, v.49, p.19-24, 2009.

GRAHAM, P.H.; VANCE, C.P. Legumes: importance and constraints to greater use. **Plant Physiol.** v. 131, p. 872-877, 2003.

GUNARTO, L.; ADACHI, K.; SENBOKU, T. Isolation and selection of indigenous *Azospirillum* spp. From a subtropical island, and effect of inoculation on growth of lowland rice under several levels of N application. **Biol. Fertil. Soils**, v. 28, p.129-136, 1999.

HAHN, D.; MIRZA, B.; BENAGLI, C.; VOGEL, G.; TONOLLA, M. Typing of nitrogen-fixing *Frankia* strains by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. **Systematic and Applied Microbiology**, vol. 34, p. 63–68, 2011.

HARTMANN, A.; BALDANI, J. I. The genus *Azospirillum*. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E (eds) **The prokaryotes**. Wiley, New York, p.114–140, 2003.

HOLLAND, R.D.; WILKES, J.G.; RAFII, F.; *et al.* Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Commun Mass Spectrom**, vol. 10, no. 10, p. 1227–32, 1996.

HUNGRIA, Mariângela. Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo – Londrina: **Embrapa Soja**, 36p., 2011. ISSN 1516-781X; n.325.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant Soil**, vol. 331, p. 413–425, 2010.

JAMES, E. K.; REIS, V. M.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Infection of sugar cane by nitrogen fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. **Journal of Experimental Botany**, v. 45 p. 757-766. 1994.

KHAMAS, K. M.; AGERON, E.; GRIMONT, P. A. D.; KAISER, P. *Azospirillum irakense* sp nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. **Res. Microbiol.**, v. 140, p. 45-55, 1989.

KLIEM, M.; SAUER, S. The essence on mass spectrometry based microbial diagnostics. **Current opinion in microbiology**, v. 15, n. 3, p. 397–402, 2012.

KOUBEK, J.; UHLIK, O.; JECNA, K.; JUNKOVA, P.; VRKOSLAVOVA, J.; LIPOV, J.; KURZAWOVA, V.; MACEK, T.; MACKOVA, M. Whole-cell MALDI-TOF: Rapid screening method in environmental microbiology. **International Biodeterioration & Biodegradation**, vol. 69, p. 82-86, 2012.

KRÁSNÝ, L.; HYNEK, R.; HOCHÉL, I. Identification of bacteria using mass spectrometry techniques. **International Journal of Mass Spectrometry**, 2013.

KRISHNAMURTHY, T.; ROSS, P.L.; RAJAMANI, U. Detection of pathogenic and nonpathogenic bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Commun Mass Spectrom**, vol. 10, n. 8, p. 883–8, 1996.

LADHA J. K.; REDDY, P.M. Nitrogen fixation in rice systems: state of knowledge and future prospects, **Plant and Soil**., v. 252, p.151-167, 2003.

LASLO, É.; GYÖRGY, É.; MARA, G.; TAMÁS, É.; ÁBRAHÁM, B.; LÁNYI, S. Screening of plant growth promoting rhizobacteria as potential microbial inoculants. **Crop Protection**, vol. 40, p. 43-48, 2012.

LAVRINENKO, K.; CHERNOUSOVA, E.; GRIDNEVA, E.; DUBININA, G.; AKIMOV, V.; KUEVER, J.; LYSENKO, A.; GRABOVICH, M. *Azospirillum thiophilum* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from a sulfide spring. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, vol. 60, p. 2832-7, 2010.

LIN, S. Y.; YOUNG, C. C.; HUPFER, H.; SIERING, C.; ARUN, A. B.; CHEN, W. M.; LAI, W. A.; SHEN, F. T.; REKHA, P. D.; YASSIN, A. F. *Azospirillum picis* sp. nov.,

isolated from discarded tar. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v.59, p. 761-5, 2009.

LIN, S. Y.; SHEN, F. T.; YOUNG, L. S.; ZHU, Z. L.; CHEN, W. M.; YOUNG, C. C. *Azospirillum formosense* sp. nov., a diazotroph from agricultural soil. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 62, p. 1185-1190, 2012.

LIN, S. Y.; LIU, Y. C.; HAMEED, A.; HSU, Y. H.; LAI, W. A.; SHEN, F. T.; YOUNG, C. C. *Azospirillum fermentarium* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from a fermenter. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 63, p. 3762-3768, 2013.

MACHADO, H.B.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U.; et al. Excretion of ammonium by *Azospirillum brasilense* mutants resistant to ethylenediamine. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 549-553, 1991.

MAGALHÃES, F. M.; BALDANI, J. I.; SOUTO, S. M.; KUYKENDALL, J. R.; DÖBEREINER, J. A new acid tolerant *Azospirillum* species. **Ann. Acad. Bras. Cienc.**, v. 55, p. 417-430, 1983.

MARTINEZ-TOLEDO, M. V.; GONZALEZ-LOPEZ, J. Effect of metolachlor on *Azotobacter* nitrogen fixation in soil. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 8, p. 789–792, 1989.

MEHNAZ, S.; WESELOWSKI, B.; LAZAROVITS, G. *Azospirillum canadense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from corn rhizosphere. **Int. J. Syst. Evol. Microbio.**, v. 57, p. 620-624, 2007a.

MEHNAZ, S.; WESELOWSKI, B.; LAZAROVITS, G. *Azospirillum zeae* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from rhizosphere soil of *Zea mays*. **Int. J. Syst. Evol. Microbio.**, v. 57, p. 2805-2809, 2007b.

MONTEIRO, R. A.; SCHIMIDT, M. A.; BAURA, V. A.; BALSANELLI, E.; WASSEM, R.; YATES, M. G.; RANDI, M. A. F.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M. Early colonization pattern of maize (*Zea mays* L. Poales, Poaceae) roots by *Herbaspirillum seropedicae* (Burkholderiales, Oxalobacteraceae). **Genetics and Molecular Biology**, 31, 4, p. 932-937, 2008.

NADEEM, S. M.; AHMAD, M.; ZAHIR, Z. A.; JAVAID, A.; ASHRAF, M. The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. **Biotechnology Advances**, 2013.

OKON, Y.; ITZIGSOHN, R. The development of *Azospirillum* as a commercial inoculant for improving crop yields. **Biotechnology Advances**, vol. 13, no. 3, p. 415-424, 1995.

OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. **ASM News**, vol. 63, p. 366-370, 1997.

PATRIQUIN, D.G.; DÖBEREINER, J.; JAIN, D.K. Sites and processes of association between diazotrophs and grasses. **Canadian Journal of Microbiology**, vol. 29, p. 900-915, 1983.

PEDROSA, F.O.; YATES, M.G. Regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes of *Azospirillum brasilense* by *nifA* and *ntr (gln)* type gene products. **FEMS Microbiology Letters**, v. 23, p. 95-101, 1984.

PEDROSA, F.O. Fixação biológica de nitrogênio: fértil ideia. **Ciência hoje**, v. 6, p. 12-13, 1987.

PENG, G.; WANG, H.; ZHANG, G.; HOU, W.; LIU, Y.; WANG, E. T.; TAN, Z. *Azospirillum melinis* sp. nov., a group of diazotrophs isolated from tropical molasses grass. **Int. J. Syst. Evol. Microbio.**, v. 56, p. 1263-1271, 2006.

PICCININ, G.G.; DAN, L.G.M.; BRACCINI, A.L.; MARIANO, D.C.; OKUMURA, R.S.; BAZO, G.; RICCI, T.T. Agronomic efficiency of *Azospirillum brasilense* in physiological parameters and yield components in wheat crop. **J. Agron.**, vol. 10, no. 4, p. 132–135, 2011.

PICCININ, G.G.; BRACCINI, A.L.; DAN, L.G.M.; SCAPIM, C.A.; RICCI, T.T.; BAZO, G. Efficiency of seed inoculation with *Azospirillum brasilense* on agronomic characteristics and yield of wheat. **Industrial Crops and Products**, vol. 43, p. 393–397, 2013.

REINHOLD, B.; HUREK, T.; NIEMANN, E.G.; FENDRIK, I. Close association of *Azospirillum* and diazotrophic rods with different root zones of Kallar Grass. **Applied And Environmental Microbiology**, p. 520-526, 1986.

REINHOLD, B.; HUREK, T.; FENDRIK, I.; POT, B.; GILLIS, M.; KERSTERS, K.; THIELEMANS, S.; de LEY, J. *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a nitrogen-fixing organism associated with roots of kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth). **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.37, p.43-51, 1987.

Rede de Laboratórios para a Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola – RELARE. Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br/relare/>>. Acesso em: 22/12/2013.

RELARE. Anais da XIII Reunião da Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola (RELARE). / - Londrina: Embrapa Soja, 212 p., 2007.

RODRIGUES, L. S.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* na cultura do arroz inundado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 2, p. 275-284, 2006.

RONCATO-MACCARI, L. D. B.; RAMOS, H. J. O.; PEDROSA, F. O.; ALQUINI, Y.; CHUBATSU, L. S.; YATES, M. G.; RIGO, L. U.; STEFFENS, M. B. R.; SOUZA, E. M. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses *nif* genes in gramineous plants. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 45, p. 39-47, 2003.

RUSSO, A.; VETTORI, L.; FELICI, C.; FIASCHI, G.; MORINI, S.; TOFFANIN, A.

Enhanced micropropagation response and biocontrol effect of *Azospirillum brasilense* Sp245 on *Prunus cerasifera* L. clone Mr.S 2/5 plants. **J Biotechnol.** v. 134, p. 312-319, 2008.

SÁNCHEZ-JUANES, F.; FERREIRA, L.; VEGA, P. A.; VALVERDE, A.; BARRIOSG, M. L.; RIVAS, R.; MATEOS, P. F.; MARTÍNEZ-MOLINAD, E.; GONZÁLEZ-BUITRAGO, J. M.; TRUJILLO, M. E.; VELÁZQUEZ, E. MALDI-TOF Mass Spectrometry as a tool for differentiation of *Bradyrhizobium* species: Application to the identification of *Lupinus* nodulating strains. **Systematic and Applied Microbiology**, Vol 36, Issue 8, p. 565–571, 2013.

SANTOS, R. S.; STETS, M. I.; HUERGO, L. F.; SOUZA, W. E.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; NEVES, L. A. P.; CRUZ, L. M. MS-Analyser: a whole-cell mass spectrometry analysis system for microorganisms clusterization and identification. In: 8th International Conference of the Brazilian Association for Bioinformatics and Computational Biology – X-Meeting, 2012, Campinas.

SAUER, S.; FREIWALD, A.; MAIER, T.; KUBE, M.; REINHARDT, R.; KOSTRZEWA, M.; GEIDER, K. Classification and Identification of Bacteria by Mass Spectrometry and Computational Analysis. **PLoS ONE**. v. 3, p.1-10, 2008.

SAXENA, B.; MODI, M.; MODI, V. V. Isolation and characterization of siderophores from *Azospirillum lipoferum* D-2. **Journal of General Microbiology**, v. 132, p. 2219-2224, 1986.

SESHADRI, S.; MUTHUKUMARASAMY, R.; LAKSHINARASIMHAN, C.; IGNACIMUTHU, S. Solubilization of inorganic phosphates by *Azospirillum halopraeferans*. **Current Science**, v. 79, p. 565–567, 2000.

SCHILLER, J.; SÜß, R.; ARNHOLD, J.; FUCHS, B.; LEßIG, J.; MÜLLER, M.; PETKOVIC, M.; SPALTEHOLZ, H.; ZSCHÖRNIG, O.; ARNOLD, K. Matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry in lipid and phospholipid research. **Progress in Lipid Research**, vol. 43, p. 449–488, 2004.

SLY, L. I.; STACKEBRANDT, E. Description of *Skermanella parooensis* gen. nov. , sp. nov. to accommodate *Conglomeromonas largomobilis* subsp. parooensis following the transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *largomobilis* to the genus *Azospirillum*. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 49, p. 541-544, 1999.

STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology Reviews**, vol. 24, p. 487-506, 2000.

STEPHENS, J.H.G.; RASK, H.M. Inoculant production and formulation. **Field Crops Research**, vol. 65, p. 249-258, 2000.

STETS, M. I.; PINTO, A. S. JR.; HUERGO, L. F.; SOUZA, E. M.; GUIMARAES, V. F.; ALVES, A. C.; STEFFENS, M. B. R.; MONTEIRO, R. A.; PEDROSA, F. O.; CRUZ, L. M. Rapid identification of bacterial isolates from wheat roots by high resolution whole cell MALDI-TOF MS analysis. **Journal of Biotechnology**, vol. 165, p. 167– 174,

2013a.

STETS, M. I. **Monitoramento de *Azospirillum brasilense* e estudo da diversidade bacteriana associada a raízes de trigo (*Triticum aestivum*)**. 109 p. Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013b.

TANAKA, K.; FENN, J.B. Nobel Laureates in chemistry. Disponível em <http://www.nobelprize.org>. 2002.

TARRAND, J. J.; KRIEG, N. R.; DOBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Can. J. Microbiol.**, v. 24, n. 8, p. 967-80, 1978.

THULER, D.; FLOSH, E.; HANDRO, W.; BARBOSA, M. Plant growth regulators and aminoacids released by *Azospirillum* sp. In chemically defined medium. **Letters Applied Microbiology**, v. 37, p.174–178, 2003.

TIEN, T. M.; GASKINS, M. H.; HUBBELL, D. H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, p. 1016-1024, 1979.

Validation of the Publication of New Names and New Combinations Previously Effectively Published Outside the IJSB. List No. 62. **International Journal of Systematic Bacteriology**, p. 915-916, 1997.

VAN VEEN, S.Q.; CLAAS, E.C.; KUIJPER, E.J. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. **J Clin Microbiol**, v. 48, p. 900–907, 2010.

VELOO, A.C.M.; WELLING, G.W.; DEGENER, J.E. The identification of anaerobic bacteria using MALDI-TOF MS. **Anaerobe**, vol. 17, p. 211-212, 2008.

WISNIEWSKI-DYE, F.; BORZIAK, K.; KHALSA-MOYERS, G.; ALEXANDRE, G.; SUKHARNIKOV, L.O.; WUICHET, K.; HURST, G. B.; MCDONALD, W. H.; ROBERTSON, J. S.; BARBE, V.; CALTEAU, A.; ROUY, Z.; MANGENOT, S.; PRIGENT-COMBARET, C.; NORMAND, F.; BOYER, M.; SIGUIER, P.; DESSAUX, Y.; ELMERICH, C.; CONDEMIN, G.; KRISHNEN, G. S.; KENNEDY, I.; PATERSON, A. H.; GONZALEZ, V.; MAVINGUI, P.; ZHULIN, I. B. *Azospirillum* genomes reveal transition of bacteria from aquatic to terrestrial environments. **PLoS Genet.** v. 7, 2011.

WU, P.; OZHANG G.; LADHA, J. K.; MCCOUCH, S.R.; HUANG, N. Molecular-marker-facilitated investigation on the ability to stimulate N₂ fixation in the rhizosphere by irrigated rice plants. **Theor. Appl. Genet.** vol. 91, p. 1171-1183, 1995.

XIE, C. H.; YOKOTA, A. *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium

isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa*. **Int. J. Syst. Evol. Microbio.**, v.55, p.1435-1438, 2005.

YOUNG, J.P.W.; DOWNER, H.L.; EARDLY, B.D. Phylogeny of the Phototrophic Rhizobium Strain BTail by Polymerase Chain Reaction-Based Sequencing of a 16S rRNA Gene Segment. **Journal Of Bacteriology**, Vol. 173, No. 7, p. 2271-2277, 1991.

YOUNG, J. P. W. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In: STACEY, G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H. J. (eds.). Biological Nitrogen Fixation. London: Chapman ; Hall, New York, p. 43-86, 1992.

YOUNG, C. C.; HUPFER, H.; SIERING, C.; HO, M. J.; ARUN, A. B.; LAI, W. A.; REKHA, P. D.; SHEN, F. T.; HUNG, M. H.; CHEN, W. M.; YASSIN, A. F. *Azospirillum rugosum* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil. **Int. J. Syst. Evol. Microbio.**, v. 58, p.959-963, 2008.

ZHOU, S.; HAN, L.; WANG, Y.; YANG, G.; ZHUANG, L.; HU, P. *Azospirillum humicireducens* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from a microbial fuel cell. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 63, p. 2618-2624, 2013.

ZIEGLER, D.; MARIOTTI, A.; PFLÜGER, V.; SAAD, M.; VOGEL, G.; TONOLLA, M.; PERRET, X. *In situ* identification of plant-invasive bacteria with MALDI-TOF Mass Spectrometry. **Plos One**, vol. 7, issue 5, e37189, 2012.
doi:10.1371/journal.pone.0037189.

APÊNDICES

Tabela 13. CONTAGEM DE UFC/mL DO INOCULANTE 1.

Diluição	Meio de cultura			
	NA	BDA	DYGS	NFb 3x
	UFC/ml	UFC/ml	UFC/ml	UFC/ml
10 ⁻⁵	420	SC	350	280
	390	30	420	250
	370	10	390	350
Média	3,9x10 ⁷	0,13x10 ⁷	3,87x10 ⁷	2,93x10 ⁷
10 ⁻⁶	70	SC	80	50
	40		50	20
	40		50	20
Média	0,5x10 ⁸		0,6x10 ⁸	0,3x10 ⁸
10 ⁻⁷	SC	SC	10	10
		10	10	SC
		30	SC	SC
Média		1,33x10 ⁸	0,67x10 ⁸	0,33x10 ⁸

Os meios de cultura NA, BDA, DYGS e NFb 3x são recomendados pelo protocolo da RELARE. A contagem das células viáveis procedeu da seguinte forma: p. ex., na diluição 10⁻⁵ contou-se 39 colônias em 100 µL, então obtivemos 390 UFC/mL em 10⁻⁵. A contagem não alcançou o número recomendado pela embalagem do produto, 3x10⁸ UFC/mL, mesmo dentro do prazo de validade. Contudo os valores foram próximos. (SC) sem crescimento.

Tabela 14. CONTAGEM DE UFC/mL DO INOCULANTE 2.

Diluição	NA	BDA	DYGS	NFb 3x
	UFC/ml	UFC/ml	UFC/ml	UFC/ml
10 ⁻⁵	410	SC	1360	100
	1400		1400	1470
	1330		1260	1810
Média	1,04x10 ⁸		1,34x10 ⁸	1,13x10 ⁸
10 ⁻⁶	40	SC	110	130
	10		160	130
	90		150	120
Média	0,5x10 ⁸		1,4x10 ⁸	1,3x10 ⁸
10 ⁻⁷	20	SC	SC	10
	20		10	10
	SC		10	10
Média	0,13x10 ⁸		0,67x10 ⁸	0,1x10 ⁸

Os valores da contagem de células viáveis por mL não atingiram o número recomendado pela embalagem do produto, porém foram muito próximos. (SC) sem crescimento.

Tabela 15. CONTAGEM DE UFC/mL DO INOCULANTE 3.

Diluição	NA UFC/ml	BDA UFC/ml	DYGS UFC/ml	NFb 3x UFC/ml
10 ⁻⁵	1280	SC	1160	350
	1390		1350	190
	2150		920	420
Média	1,607x10 ⁸		1,143x10 ⁸	3,2x10 ⁸
10 ⁻⁶	50	SC	20	10
	70		2000	SC
	50		SC	30
Média	5,667x10 ⁷		7,3x10 ⁷	1,3x10 ⁷
10 ⁻⁷	20	SC	30	SC
	20		20	
	10		30	
Média	1,667x10 ⁸		2,667x10 ⁸	

Os valores de UFC/mL foram muito próximos do valor garantido na embalagem, entretanto não atingiram o número especificado na embalagem. (SC) sem crescimento.

Tabela 16. CONTAGEM DE UFC/mL DO INOCULANTE 4.

Diluição	NA UFC/ml	BDA UFC/ml	DYGS UFC/ml	NFb 3x UFC/ml
10 ⁻⁵	110	SC	470	200
	240		570	200
	150		500	450
Média	1,67x10 ⁷		5,13x10 ⁷	2,8x10 ⁷
10 ⁻⁶	50	SC	100	SC
	70		70	SC
	70		70	50
Média	6,33x10 ⁷		8x10 ⁷	1,67x10 ⁷
10 ⁻⁷	SC	SC	SC	SC
	SC		10	10
	10		SC	SC
Média	0,33x10 ⁸		0,33x10 ⁸	0,33x10 ⁸

(SC) sem crescimento.

Tabela 17. CONTAGEM DE UFC/mL DO INOCULANTE 5.

Diluição	NA UFC/ml	BDA UFC/ml	DYGS UFC/ml	NFb 3x UFC/ml
10 ⁻⁵	90	SC	210	800
	280		150	710

	220		40	620
Média	$1,97 \times 10^7$		$1,33 \times 10^7$	$7,1 \times 10^7$
10^{-6}	20	SC	20	70
			20	10
Média	$0,67 \times 10^7$		$1,33 \times 10^7$	$3,33 \times 10^7$
10^{-7}	10	SC	10	10
Média	$0,33 \times 10^8$		$0,33 \times 10^8$	$0,33 \times 10^8$

(SC) sem crescimento.

Tabela 18. CONTAGEM DE UFC/mL DO INOCULANTE 6.

Diluição	NA UFC/ml	BDA UFC/ml	DYGS UFC/ml	NFb 3x UFC/ml
10^{-5}	660	SC	600	610
	1560		1560	1030
	950		1350	830
Média	$1,057 \times 10^8$		$1,17 \times 10^8$	$8,2 \times 10^7$
10^{-6}	160	SC	140	30
	330		90	20
	200		100	230
Média	$2,3 \times 10^8$		$1,1 \times 10^8$	$9,33 \times 10^7$

(SC) sem crescimento.

Tabela 19. CONTAGEM DE UFC/mL DO INOCULANTE 7.

Diluição	NA UFC/ml	BDA UFC/ml	DYGS UFC/ml	NFb 3x UFC/ml
10^{-5}	3000	3000	3000	SC
	3000	3000	3000	
	3000	3000	3000	
Média	3×10^8	3×10^8	3×10^8	
10^{-6}	320	320	290	SC
	310	120	200	
		250	120	
Média	$2,1 \times 10^8$	$2,3 \times 10^8$	$2,03 \times 10^8$	
10^{-7}	40	40	20	SC
	SC	10		
	SC	40		
Média	$1,33 \times 10^8$	3×10^8	$2,67 \times 10^8$	

(SC) sem crescimento.

ANEXOS

ANEXO 1 – LEI Nº 6.894.....	84
ANEXO 2 – LEI Nº 12.890.....	86
ANEXO 3 – Protocolo para a análise da qualidade e da eficiência agronômica de inoculantes, estirpes e outras tecnologias relacionadas ao processo de fixação biológica do nitrogênio em plantas não leguminosas RELARE.....	88
ANEXO 4 – Protocolo do meio de cultura Nfb 3x.....	101

ANEXO 1

LEI Nº 6.894, de 16 de dezembro 1980

Dispõe sobre a inspeção e fiscalização da produção e do comércio de fertilizantes, corretivos, inoculantes, estimulantes ou biofertilizantes, destinados à agricultura, e dá outras providências.

O PRESIDENTE DA REPÚBLICA. Faço saber que o Congresso Nacional decreta e eu sanciono a seguinte Lei:

Art. 1º - Fica estabelecida a obrigatoriedade da inspeção e da fiscalização da produção e do comércio de fertilizantes, corretivos, inoculantes, estimulantes ou biofertilizantes, destinados à agricultura.

Art. 2º - A Inspeção e a fiscalização previstas nesta Lei serão realizadas pelo Ministério da Agricultura.

Parágrafo Único - O Ministério da Agricultura poderá delegar a fiscalização do comércio aos Estados, ao Distrito Federal e aos Territórios.

Art. 3º - Para efeito desta Lei, considera-se:

- a) **fertilizante**, a substância mineral ou orgânica, natural ou sintética, fornecedora de um ou mais nutrientes vegetais;
- b) **corretivo**, o material apto a corrigir uma ou mais características desfavoráveis do solo;
- c) **inoculante**, o material que contenha microorganismos fixadores de nitrogênio e que atue favoravelmente no desenvolvimento das plantas;
- d) **estimulante ou biofertilizante**, o produto que contenha princípio ativo apto a melhorar, direta ou indiretamente, o desenvolvimento das plantas.

Art. 4º - As pessoas físicas ou jurídicas que produzam ou comercializem fertilizantes, corretivos, inoculantes, estimulantes ou biofertilizantes ficam obrigadas a promover o seu registro no Ministério da Agricultura, conforme dispuser o regulamento.

§ 1º (VETADO)

§ 2º - Os produtos a que se refere este artigo deverão ser igualmente registrados no Ministério da Agricultura.

Art. 5º - A infração às disposições desta Lei acarretará, nos termos previstos em regulamento, a aplicação das seguintes sanções:

I. Advertência;

II. Multa igual a 5 (cinco) vezes o valor das diferenças para menos, entre o teor dos macronutrientes primários indicados no registro do produto e os resultados apurados na análise, calculada sobre o lote de fertilizante produzido, comercializado ou estocado;

III. Multa de até 100 (cem) vezes o maior valor de referência estabelecido na forma da Lei nº 6.205, de 29 de abril de 1975;

IV. Embargo do produto;

V. Suspensão ou cancelamento do registro;

VI. Interdição, temporária ou definitiva, do estabelecimento.

§ 1º - A multa poderá ser aplicada isolada ou cumulativamente com outras sanções.

§ 2º - A aplicação das sanções previstas neste artigo não prejudicará a apuração das responsabilidades civil e penal.

Art. 6º - A inspeção e fiscalização serão retribuídas por taxas, calculadas com base no maior valor de referência resultante da Lei nº 6.205, de 29 de abril de 1975, de acordo com a tabela anexa.

§ 1º - A inspeção será retribuída por preços públicos, sempre que solicitada pelas pessoas físicas ou jurídicas a que se refere esta Lei.

§ 2º - Nos termos do regulamento, o Ministro de Estado da Agricultura estabelecerá os valores e a forma de recolhimento dos preços públicos.

Art. 7º - O Poder Executivo determinará as providências que forem necessárias ao controle da inspeção e da fiscalização previstas nesta Lei.

Art. 8º - Esta Lei entrará em vigor na data de sua publicação.

Art. 9º - Revogam-se a Lei nº 6.138, de 8 de novembro de 1974, e demais disposições em contrário.

Brasília, em 16 de dezembro de 1980; 159º da Independência e 92º da República.

JOÃO FIGUEIREDO
Angelo Amaury Stábile

ANEXO 2

LEI Nº 12.890, de 10 dezembro de 2013

Altera a Lei nº 6.894, de 16 de dezembro de 1980, para incluir os remineralizadores como uma categoria de insumo destinado à agricultura, e dá outras providências.

O VICE-PRESIDENTE DA REPÚBLICA no exercício do cargo de PRESIDENTE DA REPÚBLICA Faço saber que o Congresso Nacional decreta e eu sanciono a seguinte Lei:

Art. 1º – A Lei Nº 6.894, de 16 de dezembro de 1980, passa a vigorar com as seguintes alterações:

“Art. 1º – A inspeção e a fiscalização da produção e do comércio de fertilizantes, corretivos, inoculantes, estimulantes ou biofertilizantes, remineralizadores e substratos para plantas, destinados à agricultura, são regidos pelas disposições desta Lei.” (NR)

“Art. 3º

e) **remineralizador**, o material de origem mineral que tenha sofrido apenas redução e classificação de tamanho por processos mecânicos e que altere os índices de fertilidade do solo por meio da adição de macro e micronutrientes para as plantas, bem como promova a melhoria das propriedades físicas ou físico-químicas ou da atividade biológica do solo;

f) **substrato para plantas**, o produto usado como meio de crescimento de plantas.” (NR)

“Art. 4º – As pessoas físicas ou jurídicas que produzam ou comercializem fertilizantes, corretivos, inoculantes, estimulantes ou biofertilizantes, remineralizadores e substratos para plantas são obrigadas a promover o seu registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, conforme dispuser o regulamento.

.....” (NR)

Art. 2º A Lei Nº 6.894, de 16 de dezembro 1980, passa a vigorar com a seguinte ementa:

“Dispõe sobre a inspeção e a fiscalização da produção e do comércio de

fertilizantes, corretivos, inoculantes, estimulantes ou biofertilizantes, remineralizadores e substratos para plantas, destinados à agricultura, e dá outras providências.”

Art. 3º – Esta Lei entra em vigor na data de sua publicação.

Brasília, 10 de dezembro de 2013; 192º da Independência e 125º da República.

MICHEL TEMER

Antônio Andrade

Edison Lobão

Izabella Mônica Vieira Teixeira

ANEXO 3

124

Embrapa Soja. Documentos, 290

Protocolo para a análise da qualidade e da eficiência agronômica de inoculantes, estirpes e outras tecnologias relacionadas ao processo de fixação biológica do nitrogênio em plantas não leguminosas

Protocolo apresentado pela pesquisadora Vera Baldani da Embrapa Agrobiologia na XI RELARE e aprovado na XIII RELARE.

Introdução

As bactérias diazotróficas associativas possuem a capacidade de se multiplicar, colonizar e infectar as raízes e/ou a parte aérea das plantas não leguminosas, penetrando nos tecidos das plantas através de feridas, aberturas naturais (estômatos) ou por ocasião da ruptura da raiz principal, na emergência das raízes secundárias e pêlos radiculares, não formando estruturas visíveis, como os nódulos das plantas leguminosas, podendo assim estabelecer uma associação endofítica ou não com estas plantas. Essas bactérias diazotróficas possuem o complexo enzimático, nitrogenase, que consegue quebrar a ligação tripla do nitrogênio do ar (N_2), transformando-o em amônia (NH_3). A amônia é então incorporada em diversas formas de N orgânico para ser então utilizada pela planta hospedeira.

A eficiência do processo de fixação biológica do nitrogênio (FBN) depende de fatores bióticos e abióticos. Isto é, vários fatores inerentes ao ambiente, à fisiologia e à biologia da planta, da cultivar e da bactéria. Entre estes, destacam-se os fatores físicos do solo, como temperatura, pH, umidade, etc., os fatores genéticos e nutricionais ligados à planta e a eficiência da estirpe utilizada. Além desses fatores, estudos de competitividade entre as estirpes introduzidas com as nativas no solo têm mostrado que aumentando a população da bactéria, introduzida nas sementes através de inoculação, ocorre um melhor estabelecimento da estirpe no solo, permitindo assim, uma melhor competitividade da estirpe introduzida, o que por consequência, pode proporcionar maior eficiência de FBN. Assim, a má qualidade do inoculante, sistemas inadequados de inoculação, armazenamento do inoculante e a aplicação de certos fungicidas ou inseticidas nas sementes, entre outros fatores, podem implicar na redução do número de células viáveis nas sementes ou no solo, e podem resultar em uma menor eficiência da FBN.

Definições

- **Recomendação de estirpes** – Para que uma determinada estirpe de bactéria diazotrófica possa fazer parte de inoculantes comerciais está terá que ser testada por órgãos de pesquisa oficiais, segundo os protocolos aqui descritos, com os resultados discutidos em reunião da RELARE e por esta recomendada ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para produção de inoculantes.
- **Inoculantes** – Todo produto que contenha microrganismos com ação estimulante para o crescimento das plantas.
- **Outras tecnologias** – Novos processos de veiculação de microrganismos fixadores de nitrogênio para gramíneas, ou novo produto contendo microrganismos promotores de crescimento para plantas leguminosas e não leguminosas. Ou ainda novos produtos oriundos dos microrganismos, que possam beneficiar o crescimento das plantas não leguminosas.

Novos produtos, contendo estirpes, tecnologia e outras recomendações discutidas e aprovadas nas reuniões da RELARE, deverão receber parecer provisório para fins de registro pelo MAPA. Para obtenção do parecer definitivo, deverão ser submetidos aos testes de eficiência agrônômica, seguindo as orientações do presente protocolo. Esses testes deverão ser conduzidos por instituições de pesquisa credenciadas junto ao MAPA e obedecer às normas definidas pela RELARE (ou publicadas em portaria). A aprovação ou não do produto ou tecnologia se dará após análise dos resultados pela RELARE. Para evitar que um produto seja testado inúmeras vezes e que os resultados negativos sejam desconsiderados, o fabricante ou responsável pelo inoculante terá que comunicar a RELARE cada teste a campo no início da safra. Testes não comunicados com a devida antecedência não serão considerados pela RELARE.

A proposta de recomendação de novas estirpes de bactérias fixadoras de N_2 para determinada cultura, que já tenha estirpes recomendadas, deverá apresentar resultados comparativos em relação às estirpes já recomendadas.

Avaliação de estirpes e testes de eficiência agrônômica de novos inoculantes ou tecnologias de inoculação.

Os experimentos de avaliação de novas estirpes e testes de eficiência agrônômica de novos inoculantes ou tecnologias de inoculação devem contemplar testes de laboratório, casa de vegetação e a campo. No caso de campo, os experimentos deverão ser conduzidos em, pelo menos duas regiões ou ecossistemas de importância para a cultura em questão e em duas safras agrícolas, ou ainda em 4 regiões em uma única safra desde que obedeça aos critérios descritos na metodologia de avaliação de estirpes, apresentados neste protocolo.

1. Análise da Qualidade de Inoculantes

1.1. Preparo da amostra

A amostra do produto a ser testado deverá ser composta por duas subamostras "A" e "B", que deverão ser individualmente identificadas, homogeneizadas e posteriormente higienizadas externamente, com álcool etílico a 75%, em sala asséptica, a fim de evitar contaminantes. As análises serão compostas por exames decisórios, quanto ao aspecto do enquadramento às exigências mínimas (teste de germinação das sementes, teste de pureza das estirpes utilizadas para a inoculação, teste quantitativo, número de células viáveis e culturáveis em seu respectivo meio de cultura e teste de avaliação de sementes pré-inoculadas), e identificativos, quanto ao aspecto do enquadramento às exigências mínimas, e complementares (temperatura, pH e umidade), que servirão para dar subsídios ao resultado do exame quantitativo empregado.

1.2. Teste de Pureza dos Inoculantes

A fim de proporcionar uma cobertura adequada para a expressão e quantificação dos microrganismos, diferentes dos especificados na rotulagem dos produtos inoculantes (contaminantes), serão empregados os meios diferenciais (ágar nutritivo (AN), Dygs e/ou batata). Deverão ser utilizadas, para o teste de pureza, as mesmas diluições elaboradas para o exame analítico das amostras dos produtos inoculantes. Para testar a presença de microrganismos contaminantes serão inoculadas placas de Petri com alíquotas de 0,1 mL das diluições seriadas 10^{-3} a 10^{-6} , em triplicatas com meios diferenciais.

Após a absorção do inóculo, as placas deverão ser colocadas invertidas em

estufa a 30°C e observadas pelo período de 5 a 7 dias, quando então, será efetuada a leitura final. Os resultados serão expressos para cada um dos meios diferenciais (NA, Dygs ou Batata), de acordo com a média do número de unidades formadoras de colônia por mililitro de inóculo (UFC/mL).

Resultado Final: O cálculo para o resultado final será a média originada da sub amostra "A" com a sub amostra "B".

Diluição seriada decimal: A diluição seriada é empregada para possibilitar a contagem através da semeadura em placas de Petri, contendo meio sólido, ou através do método do Número Mais Provável (NMP) em frascos contendo meio semi-sólido, semi-seletivo para cada bactéria utilizada como inóculo, possibilitando a determinação do número de células viáveis dentro dos intervalos de segurança propostos por cada uma das técnicas empregadas. Para formar a diluição 10^{-1} , retirar 10,0 g ou 10,0 mL do produto inoculante e adicionar em um frasco Erlenmeyer com 90,0 mL de solução salina (1/4 dos sais do meio de cultura NFb), colocando para homogeneizar a solução em agitador orbital pelo período de tempo de 1 minuto. Logo em seguida, retirar uma alíquota de 1,0 mL desta solução e acrescentar em um tubo de ensaio com 9,0 mL de solução salina, procedendo à homogeneização desta solução em um agitador de tubos, formando assim, a diluição 10^{-2} . Da diluição 10^{-2} , retirar 1,0 mL e adicionar em outro tubo de ensaio com 9,0 mL de solução salina, formando na sequência, a diluição 10^{-3} . E assim sucessivamente, usando sempre a última diluição, até formar as diluições desejadas (figura 1). O uso da solução salina para a diluição decimal em série é importante para a estabilidade osmótica das células dos microrganismos que estão sendo testados. No caso dos inoculantes não solúveis em água, os fabricantes deverão informar qual o diluente a ser usado.

Meio ágar nutritivo (AN): Meio indicado para o desenvolvimento de bactérias viáveis e culturáveis. Este meio favorece o crescimento de contaminantes em detrimento do crescimento das bactérias diazotróficas, que demoram mais tempo para se multiplicar. A esterilização deve ser feita por autoclavagem a 121°C e 1 atmosfera por 10 minutos, a fim de evitar reações secundárias com a glicose. O pH final deverá estar em torno de 6,8.

- Meio ágar nutritivo (AN)

- 3,0 g Extrato de Carne
- 10,0g peptona
- 2,5 g Glicose
- 15,0 g Agar
- 1000 mL Água destilada
- Meio de cultura Batata (*Herbaspirillum* spp. e *Azospirillum* spp.)
 - 200 g de batata
 - 2,5 g de ácido málico
 - 2,5 g de açúcar cristal
 - 2 ml de solução de micronutrientes*
 - 1 ml de solução de vitaminas**
 - 15,0g Agar
- Solução de micronutrientes
 - $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,200g
 - $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,235g
 - H_3BO_3 0,280g
 - $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,008g
 - $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,024g
 - Completar o volume para 200 ml com água destilada.
- ** Solução de vitamina (dissolver em banho maria)
 - Biotina.....10mg
 - Pyridoxol-HCl.....20mg
 - Água destilada 100mL

Modo de Preparo: Pesar 200 g de batata inglesa, descascar, lavar e ferver durante 30 minutos. Em seguida, filtrar em funil com algodão. Misturar as quantidades de ácido málico e açúcar cristal dissolvendo-as em água destilada, até 50 mL e ajustando o pH para 6,5 a 7,0 com KOH. Adicionar ao filtrado essa solução e as soluções de micronutrientes e vitaminas. Completar o volume para 1000 mL, com água destilada.

- Meio Dygs
 - 2,0g Glicose
 - 2,0g Ácido Málico
 - 1,5g Peptona bacteriológica

- 2,0g Extrato de levedura
- 0,5g $K_2 HPO_4$
- 0,5g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
- 1,5g Ácido glutâmico
- 1000ml água destilada

Ajustar o pH de acordo com o metabolismo da bactéria em teste. Por exemplo: *Azospirillum* spp. pH 6.8 e *Herbaspirillum* spp. pH 6.0. Para meio sólido acrescentar 15g/l de agar

1.2.1. Limite dos contaminantes: O desenvolvimento de microrganismos não especificados a partir da diluição $1,0 \times 10^{-5}$ considera o lote ou partida da amostra fora dos padrões para comercialização, mesmo que apresente as garantias mínimas estabelecidas do número de bactérias diazotróficas por grama ou mililitro da amostra.

1.3. Método quantitativos para contagens de bactérias diazotróficas

Deverá ser observado um dos métodos a seguir, para a contagem das células do inóculo:

o método da diluição e contagens em placas ou o método do Número Mais Provável (NMP) utilizando-se a tabela de Mc Crady. Para isso deverá ser utilizado meio semi sólido para o microrganismo em questão.

Exemplo: meio JNFb para *Herbaspirillum seropedicae*

meio NFb para *Azospirillum brasilense* e *A. lipoferum*

1.3.1. Diluição e contagem em placas

Para a contagem do número de células do inóculo poderá ser empregada a contagem pelo método de contagem direta "surface" ou método do espalhamento. Como meio de cultura, será utilizado o meio nutriente agar, Dygs ou batata, no volume de 15 a 20 mL de meio por placa de petri.

1.3.1.1. Contagem pelo método "Surface" ou espalhamento

Consiste em semear 0,1mL das diluições seriadas 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8} das soluções dos inoculantes na superfície do meio nutriente ágar, Dygs ou batata, distribuídos em placas de Petri que deverão ser semeadas, após solidificação do agar. Cada diluição terá três repetições em placas distintas e será espalhada sobre o meio de cultura com alça de Drigalski, de

modo que não toque a lateral da placa, a fim de distribuir uniformemente as células do microrganismo. As placas, após a semeadura e absorção do inóculo, deverão ser colocadas invertidas em estufa a 30°C pelo período de 5 a 7 dias, quando então, será efetuada a contagem. A média das UFC da diluição que apresentar um número de colônias entre 30 a 200 UFC por mililitro será considerada na avaliação final.

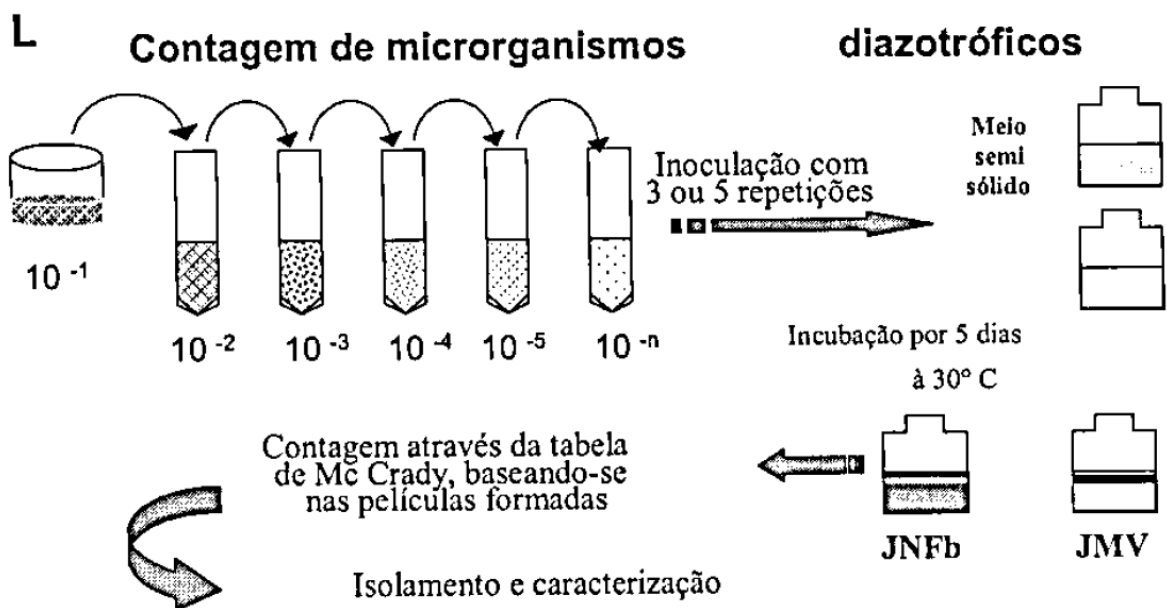
Cálculo: Multiplicar a média do número de colônias (UFC/0,1mL) das três placas de petri pela diluição que proporcionou a leitura no intervalo de 30 a 200 UFC/0,1mL e pelo fator de correção 10 da alíquota empregada de 0,1mL

Exemplo: Admitindo-se que o número médio de colônia das três placas foi de 50 UFC/0,1mL e a diluição que proporcionou esta leitura foi a 10^{-6} . Então, calcula-se:

Dados: Média = 50

Fator de correção = 10; Diluição de leitura = 10^{-6} ; Logo: Número de células do microrganismo = $50 \times 10 \times 10^{-6} = 5,0 \times 10^{-8}$ UFC/g ou mililitro de inoculante.

1.3.2. Método do número mais provável (NMP)



O método do NMP é um processo indireto de contagem que envolve a inoculação, em triplicata de 0,1mL de cada solução diluída crescente a diluição seriada decimal. A solução deverá ser preparada no momento do uso e os tubos serão inoculados com quatro ou cinco (10^{-6} a 10^{-9} ou 10^{-10}) diluições. A inoculação consistirá na adição de alíquotas de 1,0 mL de cada diluição por tubo (unidade teste) que constarão em triplicatas.

Deverão ser incluídos tubos controles positivos e negativos e o crescimento se dará em câmara de crescimento.

A contagem do NMP em meio semi específico deverá ser feita da seguinte forma: 0,1mL de cada solução diluída crescente do produto inoculante deverá ser colocado em frascos contendo meio de cultura semi-sólidos e semi-específicos de acordo com o diazotrófico a ser testado, utilizando-se as diluições de 10^{-6} a 10^{-9} ou 10^{-10} . Este método pressupõe que a formação de película no meio semi-sólido, confere caráter positivo ao teste, enquanto que a ausência de película implica em caráter negativo do mesmo. A partir da contagem do inoculo, no meio de cultura, o teste demanda 5 a 7 dias para a sua conclusão e se vale da tabela de Mc Crady (Dobereiner et al., 1995), para a estimativa do número de células presentes no inoculante.

Testes positivos e negativos: O controle positivo ou negativo é indicativo da não interferência de fatores externos, que podem ocorrer na técnica de contagem do NMP. Para compor o teste positivo, utiliza-se uma cultura pura de bactéria específica, onde serão utilizadas alíquotas e repetições das mesmas diluições empregadas nos exames dos produtos inoculantes. O controle negativo será composto, unicamente, do substrato utilizado para a produção do inoculante, com o número de frascos do teste positivo e nas mesmas diluições utilizadas no controle positivo. O teste negativo, poderá também ser utilizado como controle.

Meio semi-seletivo: No caso da avaliação de produtos inoculantes específicos para determinadas culturas, que contenham um número elevado de contaminantes, o número de células estabelecidas como garantia, será verificado utilizando-se o meio semi-seletivo (Dobereiner et al., 1995), que permitam o crescimento do inoculo em uso e inibam o crescimento de contaminantes. O meio semi-seletivo será preparado em duas fases. A primeira, quando o meio é distribuído em frascos tipo penicilina ou tubo de

Tabela de McCrady para cálculo do Número Mais Provável (NMP) de bactérias diazotróficas em contagem com três e cinco frascos/diluição.

A - 3 tubos/diluição					
Diluição com crescimento	Nº de diazotró- ficos	Diluição com crescimento	Nº de diazotró- ficos	Diluição com crescimento	Nº de diazotró- ficos
000	0,0	201	1,4	302	6,5
001	0,3	202	2,0	310	4,5
010	0,3	210	1,5	311	7,5
011	0,6	211	2,0	312	11,5
020	0,6	212	3,0	313	16,0
100	0,4	220	2,0	320	9,5
101	0,7	221	3,0	321	15,0
102	1,1	222	3,5	322	20,0
110	0,7	223	4,0	323	30,0
111	1,1	230	3,0	330	25,0
120	1,1	231	3,5	331	45,0
121	1,4	232	4,0	332	110,0
130	1,6	300	2,5	333	140,0
200	0,9	301	4,0	-	-

B - 5 tubos/diluição							
Diluição com cresc.	Nº diazo- tróficos	Diluição com cresc.	Nº diazo- tróficos	Diluição cresc.	Nº Diazo- tróficos	Diluição cresc.	Nº de diazo- tróficos
000	0,0	203	1,2	400	1,3	513	8,5
001	0,2	210	0,7	401	1,7	520	5,0
002	0,4	211	0,9	402	2,0	521	7,0
010	0,2	212	1,2	403	2,5	522	9,5
011	0,4	220	0,9	410	1,7	523	12,0
012	0,6	221	1,2	411	2,0	524	15,0
020	0,4	222	1,4	412	2,5	525	17,5
021	0,6	230	1,2	420	2,0	530	8,0
030	0,6	231	1,4	421	2,5	531	11,0
100	0,2	240	1,4	422	3,0	532	14,0
101	0,4	300	0,8	430	2,5	533	17,5
102	0,6	301	1,1	431	3,0	534	20,0
103	0,8	302	1,4	432	4,0	535	25,0
110	0,4	310	1,1	410	3,5	540	13,0
111	0,6	311	1,4	441	4,0	541	17,0
112	0,8	312	1,7	450	4,0	542	25,0
120	0,6	313	2,0	451	5,0	543	30,0
121	0,8	320	1,4	500	2,5	544	35,0
122	1,0	321	1,7	501	3,0	545	45,0
130	0,8	322	2,0	502	4,0	550	25,0
131	1,0	330	1,7	503	6,0	551	35,0
140	1,1	331	2,0	504	7,5	552	60,0
200	0,5	340	2,0	510	3,5	553	90,0
201	0,7	341	2,5	511	4,5	554	160,0
202	0,9	350	2,5	512	6,0	555	180,0

ensaio e esterilizado em autoclave a 121°C a 1 atmosfera por cerca de 15 minutos. A segunda fase, partindo dos meios semi-seletivos sólidos, após a autoclavagem e imediatamente antes da solidificação do agar (temperatura entre 45 e 50°C) serão vertidos em placas de Petri, no volume de 15 a 20 mL de meio por placa.

Meios semi seletivos

- Meio de cultura JMV (para *Burkholderia* spp.)
 - 5 g de manitol
 - 6 mL de K_2HPO_4
 - 18 mL de KH_2PO_4
 - 2 mL de $Mg SO_4 \cdot 2 H_2O$
 - 2 mL de $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$
 - 1 mL de NaCl
 - 2 mL de azul de bromotimol (solução 0,5% em 0,2 N KOH)
 - 2 mL de solução de micronutrientes*
 - 4 mL FeEDTA (solução 1,64%)
 - 1 mL solução de vitaminas**
 - Ajustar o pH para 4,5 a 5,0 e completar o volume para 1000 mL com água destilada.
 - Para o meio semi-sólido, adicionar 1,8 g de ágar/L
 - Para o meio sólido, acrescentar 20 g de ágar/L e 100 mg/L de extrato de levedura.
- Meio de cultura LGI (*Azospirillum amazonense*)
 - 5 g de sacarose ou açúcar cristal
 - 0,2 g de K_2HPO_4
 - 0,6 g de KH_2PO_4
 - 0,2 g de $Mg SO_4 \cdot 2 H_2O$
 - 0,02 g de $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$
 - 0,002 g de $Na_2Mo_4 \cdot 2 H_2O$
 - 5 mL de azul de bromotimol (solução 0,5% em 0,2 N KOH)
 - 4 mL FeEDTA (solução 1,64%)
 - 1 mL solução de vitaminas**
 - Ajustar o pH para 6,0 a 6,2 com H_2SO_4 e completar o volume para 1000 mL com água destilada.
 - Meio semi-sólido, adicionar 1,8 g de ágar/L
 - Meio sólido, adicionar 17 g de ágar/L e 50 mg/L de extrato de levedura.
- Meio de cultura JNFb (*Herbaspirillum* spp.)
 - 5,0g de ácido málico
 - 0,6g de K_2HPO_4
 - 1,8 g de KH_2PO_4

- 0,2 g de $\text{Mg SO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$
- 0,1g de NaCl
- 0,02 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$
- 2 mL de azul de bromotimol (solução 0,5% em 0,2 N KOH)
- 2 mL de solução de micronutrientes
- 4 mL FeEDTA (solução 1,64%)
- 1 mL solução de vitaminas
- 4,5g de KOH
- Ajustar o pH para 5,8 com KOH e completar o volume para 1000 mL, com água destilada.
- Para o meio semi sólido adicionar 1,8 de agar/L
- Para o meio sólido adicionar 17g de agar/L e 50 mg/L de extrato de levedura.
- Meio de cultura NFb (*Azospirillum brasilense* e *A. lipoferum*.)
 - 5,0 g de ácido málico
 - 0,5g de K_2HPO_4
 - 0,2 g de $\text{Mg SO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$
 - 0,1g de NaCl
 - 0,02 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$
 - 2 mL de azul de bromotimol (solução 0,5% em 0,2 N KOH)
 - 2 mL de solução de micronutrientes*
 - 4 mL FeEDTA (solução 1,64%)
 - 1 mL solução de vitaminas**
 - 4,5g de KOH
 - Ajustar o pH para 6,5 ou 6,8 com NaOH e completar o volume para 1000 mL, com água destilada.
 - Meio semi-sólido, adicionar 1,8g de agar/L
 - Meio sólido, adicionar 17g/L de agar e 50 mg/L de extrato de levedura

1.4. Assepsia e desinfecção de sementes: para avaliações em condições gnotobióticas

Este processo é necessário para evitar possíveis microrganismos que estejam na semente e possam interferir na germinação da semente e competir com o microrganismo teste.

Os métodos de assepsia e desinfestação para sementes de não leguminosas (milho, trigo, arroz, cevada, aveia, etc.) variam de acordo com a cultura a ser utilizada. Entretanto, a imersão das sementes após a desinfestação, por 2 horas em água destilada e estéril se faz necessário. Este processo facilita o intumescimento e a germinação da semente.

1.5. Pré-germinação das sementes

A pré-germinação das sementes destina-se a garantir o desenvolvimento de plântulas homogêneas para o transplante em tubos de ensaio, utilizados na primeira fase do teste de seleção de estirpe, etc.

As sementes deverão ser pré-germinadas em papel de germinação ou placas de petri contendo 20 a 25mL de solução estéril agarizada a 1% (10g agar/1000mL de água). Após a solidificação do agar, as sementes desinfestadas deverão ser distribuídas uniformemente na superfície das placas. As placas deverão ser incubadas a 25-30°C por 2 dias ou até que o aparecimento da radícula e visualizadas diariamente já que o tempo de germinação difere de cultura para cultura.

1.6. Condições de Cultivo

Câmara de crescimento: A câmara de crescimento deve se constituir em uma sala asséptica com: refrigeração, controle de temperatura; luminosidade de 100 a 1000 lumens, fornecido por lâmpadas fluorescentes Gro-Lux e Branca-fria, controladas, automaticamente, por "timer" para fotoperíodo (correspondente a cada cultura); sistema automático de manutenção da umidade para 70% e estantes para receber as grades com os tubos testes dos produtos inoculantes.

Casa de vegetação: A manutenção da limpeza da casa de vegetação é crucial para o sucesso dos testes desenvolvidos. Deve ser lembrado que o processo de colonização e infecção das raízes das plantas por bactérias diazotróficas é prejudicado por temperaturas elevadas (acima de 28-30°C), sendo, portanto, necessário que a casa de vegetação disponha de sistema de refrigeração. A pintura de seus vidros com tinta branca ou uso de sombrite 65-70% permite suficiente luminosidade e atenua o problema da temperatura elevada durante o verão.

1.7. Metodologia para avaliação da eficiência da colonização das plântulas pela estirpe utilizada nos inoculantes comerciais

Porcentagem de plantas colonizadas

Tendo em vista o intervalo de tempo do preparo do inoculante ao plantio e os materiais utilizados, o método objetiva avaliar a potencialidade da infectividade da bactéria a partir do plantio de sementes (desinfestadas segundo o item 1.4) inoculadas.

Dez tubos de ensaio, com capacidade de 120ml, contendo de 50 a 60 mL da solução de Hoagland sem nitrogênio, agarizada e esterilizada. Após a solidificação do agar deverá ser colocada uma semente pré-inoculada por tubo, de forma a romper levemente a superfície do agar.

Incluir três tubos de teste positivo e três de teste negativo.

Conduzir à câmara de crescimento, conforme descrito no item 1.3.2.1.

Fazer a avaliação entre o 25° e 30° dia de crescimento das plântulas.

Avaliação: Para a contagem final, as plântulas serão coletadas entre o vigésimo quinto e o trigésimo dia de crescimento. Um grama dessas raízes deverá ser macerado em 9 ml de água ou solução salina estéril e proceder-se-á então a diluição seriada 10^{-3} a 10^{-8} no meio de cultura semi-específico do microrganismo em questão. Os resultados serão expressos em LOG do número de células por grama de material fresco. Serão considerados satisfatórios os exames que apresentarem no mínimo 80% das plantas colonizadas nestas condições.

• Solução de Hoglands

- KH_2PO_4 sol.1 M 1 ml
- K_2HPO_4 sol.1 M 1 ml
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ sol.1 M 2 ml
- $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,172g
- Solução de micronutrientes* 1 ml
- Sol. de Ferro (**). 1 ml
- Completar o volume com água destilada para 1000 ml e ajustar o pH 6,5 – 7,0
- (***) 1,21 g $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$ /100 ml de água destilada, misturar bem e adicionar 0,6 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

ANEXO 4

NFb 3X

5 g	Ácido málico	
5 mL	K ₂ HPO ₄	Sol. 10%
2 mL	MgSO ₄ .7H ₂ O	Sol. 10%
1 mL	NaCl	Sol. 10%
2 mL	CaCl ₂ .2H ₂ O	Sol. 1%
6 mL	Azul de bromotimol 0,5% em 0,2N de KOH	
2 mL	Solução de micronutrientes para meio de cultura	
4 mL	FeEDTA	Sol. 1,64%
4,5 g	KOH	
1 mL	Vitamina para meio de cultura (p.ex. Biotina)	

Completar para 1000 mL com H₂O destilada.

Ajustar o pH para 6,5 e colocar o ágar por último.

ÁGAR

Sólido – 15 g de ágar por litro de meio de cultura, colocar 50 mg de extrato de levedura por litro de meio de cultura.

Semi-sólido – 1,8 g de ágar por litro de meio de cultura (dissolver antes de distribuir o meio de cultura.